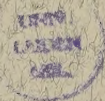


**UNTERSUCHUNGEN ZUR LOKALISIERUNG
DES PEPTIDYLTRANSFERASEZENTRUMS AN RIBOSOMEN
AUS ESCHERICHIA COLI UND BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS
UNTER ANWENDUNG DER AFFINITÄTSMARKIERUNG
MIT N-BROMACETYLPUROMYCIN UND JODAMPHENICOL**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lennart Schuster
aus Bremen

1983



**UNTERSUCHUNGEN ZUR LOKALISIERUNG
DES PEPTIDYLTRANSFERASEZENTRUMS AN RIBOSOMEN
AUS ESCHERICHIA COLI UND BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS
UNTER ANWENDUNG DER AFFINITÄTSMARKIERUNG
MIT N-BROMACETYLPUROMYCIN UND JODAMPHENICOL**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Lennart Schuster

aus Bremen

1983

1. Referent: Prof. Dr. G. Stöffler

2. Referent: Prof. Dr. V. A. Erdmann

Tag der mündlichen Prüfung: 1. 06. 1983

Druck: **Zentrale Universitäts-Druckerei** der Freien Universität Berlin

Für Monika



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546623_0014

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Struktur des Ribosoms	2
1.2. Funktion des Ribosoms	8
1.2.1. Das Peptidyltransferasezentrum	11
1.3. Affinitätsmarkierung	13
1.4. Antibiotika	15
1.4.1. Puromycin und seine Affinitätsanaloge	16
1.4.2. Chloramphenicol und seine Affinitätsanaloge	20
2. Problemstellung	22
3. Material und Methoden	23
3.1. Standardpuffer, Lösungen, Material und Geräte	23
3.1.1. Standardpuffer und Lösungen	23
3.1.2. Material und Geräte	27
3.2. Präparation von Ribosomen und deren Untereinheiten	28
3.2.1. Präparation von Ribosomen und deren Untereinheiten aus <i>Escherichia coli</i> -Zellen	28
3.2.2. Anzucht von <i>Bacillus stearothermophilus</i>	29
3.2.3. Präparation von Ribosomen und deren Untereinheiten aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> -Zellen	31
3.3. Synthese von N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin	32
3.4. Umsetzung von 30S-, 50S Untereinheiten, 70S Ribosomen und isolierten Proteinen der 50S Untereinheit	33
3.4.1. Umsetzung von 30S-, 50S Untereinheiten und 70S Ribosomen mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin	33

	Seite
3.4.2. Umsetzung von isolierten Proteinen mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin	33
3.4.3. Umsetzung von 50S Untereinheiten mit (^{14}C)-Jodacetamid	34
3.4.4. Umsetzung von isolierten Proteinen mit (^{14}C)-Jodacetamid	34
3.5. Essigsäureextraktion von Ribosomen und ihren Untereinheiten	35
3.6. RNA-Polyacrylamidgelelektrophorese	36
3.7. Methoden zur Identifizierung radioaktiv markierter Proteine	38
3.7.1. Autoradiographie	38
3.7.1.1. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann im Mikromaßstab	38
3.7.1.2. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese nach Geyl et al. im Mikromaßstab	40
3.7.1.3. Eindimensionale Celluloseacetatgelelektrophorese	41
3.7.1.4. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony	42
4. Ergebnisse und Diskussion	44
4.1. Synthese von N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin	44
4.2. Umsetzung von 50S- und 30S Untereinheiten, 70S Ribosomen und isolierten ribosomalen Proteinen von E. coli	45
4.2.1. Umsetzung von 50S- und 30S Untereinheiten, 70S Ribosomen und isolierten ribosomalen Proteinen von E. coli mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin	45
4.2.2. Umsetzung von 50S Untereinheiten und TP50 mit (^{14}C)-Jodacetamid	46

	Seite
4.3. Bindung von N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin und (^{14}C)-Jodacetamid an die ribosomale RNA der 50S Untereinheit	48
4.4. Identifizierung der mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin markierten ribosomalen Proteine von <i>E. coli</i>	49
4.4.1. Identifizierung der N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin markierten Proteine der 50S Untereinheit von <i>E. coli</i>	49
4.4.1.1. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann im Mikromaßstab	49
4.4.1.2. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese nach Geyl et al. im Mikromaßstab	53
4.4.1.3. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony	56
4.4.1.4. Eindimensionale Celluloseacetatgelelektrophorese	60
4.4.1.5. Zusammenfassung und Diskussion	63
4.4.2. Identifizierung der mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin umgesetzten Proteine der 50S Untereinheit	65
4.4.2.1. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese	65
4.4.2.2. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony	66
4.4.2.3. Eindimensionale Celluloseacetatgelelektrophorese	66
4.4.2.4. Zusammenfassung und Diskussion	67
4.4.3. Identifizierung der mit (^{14}C)-Jodacetamid umgesetzten Proteine der 50S Untereinheit	69
4.4.3.1. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony	69
4.4.3.2. Celluloseacetatgelelektrophorese	69
4.4.3.3. Zusammenfassung und Diskussion	70

	Seite
4.4.4. Identifizierung der (^{14}C)-Jodacetamid markierten Proteine der 50S Untereinheit von <i>E. coli</i>	72
4.4.4.1. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese	72
4.4.4.2. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony	72
4.4.4.3. Eindimensionale Celluloseacetatgelelektrophorese	73
4.4.4.4. Zusammenfassung und Diskussion	74
4.4.5. Identifizierung der N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin affinitätsmarkierten Proteine von <i>E. coli</i> 30S Untereinheiten	76
4.4.5.1. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese	77
4.4.5.2. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony	78
4.4.5.3. Eindimensionale Celluloseacetatgelelektrophorese	78
4.4.5.4. Ergebnisse und Diskussion	79
4.4.6. Identifizierung der N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin affinitätsmarkierten Proteine von <i>E. coli</i> 70S Ribosomen	81
4.4.6.1. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese	81
4.4.6.2. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony	82
4.4.6.3. Eindimensionale Celluloseacetatgelelektrophorese	82
4.4.6.4. Ergebnisse und Diskussion	82
4.4.7. Diskussion der Ergebnisse der Affinitätsmarkierung mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin an 70S Ribosomen und 50S Untereinheiten von <i>E. coli</i>	85
4.5. Affinitätsmarkierung von <i>E. coli</i> 50S Untereinheiten mit (^{14}C)-Jodamphenicol	97

	Seite
4.5.1. Umsetzung von E. coli 50S Untereinheiten mit (^{14}C)-Jodamphenicol	97
4.5.2. Identifizierung der mit (^{14}C)-Jodamphenicol markierten ribosomalen Proteine von 50S Untereinheiten	98
4.5.3. Diskussion der Ergebnisse der Affinitätsmarkierung mit Jodamphenicol und N-Brom-acetylpuromycin an 50S Untereinheiten von E. coli	102
4.6. Affinitätsmarkierungsexperimente mit Bacillus stearothermophilus 50S Untereinheiten zur Identifizierung der Puromycin- bzw. Chloramphenicol-Bindungsproteine	111
4.6.1. Umsetzung von B. stearothermophilus 50S Untereinheiten mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin bzw. (^{14}C)-Jodamphenicol	111
4.6.2. Bindung von N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin bzw. (^{14}C)-Jodamphenicol an die ribosomale RNA der 50S Untereinheit von B. stearothermophilus	112
4.6.3. Identifizierung der affinitätsmarkierten Proteine der 50S Untereinheit von B. stearothermophilus	112
4.6.4. Identifizierung der N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin affinitätsmarkierten Proteine	113
4.6.5. Identifizierung der (^{14}C)-Jodamphenicol affinitätsmarkierter Proteine	116
4.6.6. Diskussion der Ergebnisse der Affinitätsmarkierung von B. stearothermophilus 50S Untereinheiten mit N-Brom-acetylpuromycin und Jodamphenicol	119
5. Zusammenfassung	122
6. Literaturverzeichnis	125
7. Abkürzungsverzeichnis	136
Danksagung	137
Lebenslauf	138

1. EINLEITUNG

Friedrich Miescher entdeckte im Jahre 1869 bei Untersuchungen von Eiterzellen die Nukleinsäuren (Miescher, 1871). Erste Anhaltspunkte, daß diese Nukleinsäuren die Träger der genetischen Information sind, erhielten 70 Jahre später Knapp und seine Mitarbeiter (Knapp et al., 1939). Nach weiteren fünf Jahren gelang es der Arbeitsgruppe um Avery, die Beobachtungen Knapps durch Transformationsversuche zu beweisen (Avery et al., 1944). Ihren entscheidenden Auftrieb erhielt die Molekularbiologie, als Watson und Crick 1953 für die Desoxyribonukleinsäure (DNA) die Doppelhelixstruktur postulierten. Seitdem hat die Forschung auf dem Gebiet der Nukleinsäuren und der Biosynthese der Proteine eine rasche Entwicklung genommen, so daß man heute schon recht klare Vorstellungen von diesen molekularen Prozessen hat.

Die DNA ist ein Bestandteil jeder Zelle. Ihre Grundbausteine sind die Desoxyribonukleotide, die aus einer 2-Desoxyribose, einer organischen Base und Phosphorsäure bestehen. Die in den Nukleotiden enthaltenen Basen sind die Purinderivate Adenin und Guanin, sowie die beiden Derivate des Pyrimidins Thymin und Cytosin. Durch ihre Anordnung innerhalb der DNA wird die Primärstruktur der Proteine festgelegt. Dabei wird jede der 20 Aminosäuren durch drei Nukleotide (ein Triplet) codiert. Diese Information, die die DNA enthält, kann vom Ribosom nicht direkt genutzt werden, sondern es muß einer der komplementären Stränge der DNA in eine einzelsträngige Ribonukleinsäure (RNA), die sogenannte messenger RNA (mRNA), umgeschrieben werden (Transkription), wobei das Thymin durch Uracil ersetzt wird, und ferner die Ribose anstatt der Desoxyribose den Zuckeranteil bildet. Diese mRNA stellt die Matrize dar, von der die in der DNA enthaltene Information am Ribosom abgelesen und in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt wird (Translation).



1.1. Struktur des Ribosoms

Ribosomen sind Nukleoproteinkomplexe. Man teilt sie nach ihrer Herkunft in drei Gruppen ein. Zum einen Ribosomen aus dem Cytoplasma eukaryontischer Zellen, zum zweiten Ribosomen aus prokaryontischen Zellen, und zum dritten die Ribosomen von Zellorganellen, wie Mitochondrien und Chloroplasten, die allerdings denen prokaryontischer Zellen sehr stark ähneln.

Durch Senkung der Magnesiumkonzentration *in vitro* und am Ende der Biosynthese eines Proteins *in vivo* zerfallen alle Ribosomen in zwei verschieden große Untereinheiten, die durch den sogenannten Sedimentationskoeffizienten (S-Wert) charakterisiert werden. Dieser S-Wert gibt die Geschwindigkeit der sedimentierenden Teilchen im Schwerfeld der Zentrifuge an. Ribosomen aus dem Cytoplasma eukaryontischer Zellen sedimentieren mit 80S und ihre Untereinheiten mit 60S bzw. 40S. Je zur Hälfte bestehen sie aus Proteinen und RNA. Prokaryontische Ribosomen haben einen Sedimentationskoeffizienten von 70S, und die Untereinheiten von 50S bzw. 30S. Sie setzen sich etwa zu 2/3 aus RNA und 1/3 aus Proteinen zusammen. Die beiden Ribosomengruppen unterscheiden sich allerdings nicht nur in diesen Strukturmerkmalen, sondern auch durch die Hemmbarkeit mit verschiedenen Antibiotika. So lassen sich beide mit Puromycin hemmen, während Chloramphenicol nur auf Ribosomen prokaryontischer Zellen wirkt. Im weiteren Verlauf dieses kurzen Überblicks soll nur auf prokaryontische Ribosomen eingegangen werden, da sich diese Arbeit ausschließlich mit ihnen beschäftigt. Eine Übersicht über die Struktur und Funktion eukaryontischer Ribosomen findet man bei Wool (1979).

Die am genauesten untersuchten Ribosomen entstammen dem Darmbakterium *Escherichia coli*. Sie haben ein nahezu ellipsoides Aussehen und eine Größe von $170\text{\AA} \times 230\text{\AA} \times 250\text{\AA}$ (van Holde und Hill, 1974). Ihr Molekulargewicht beträgt $2,7 \times 10^6$ Dalton, das sich aus

$1,8 \times 10^6$ Dalton für die 50S Untereinheit und $0,9 \times 10^6$ Dalton für die 30S Untereinheit zusammensetzt. Versetzt man Ribosomen oder deren Untereinheiten mit einer äquimolaren Menge einer 8M Harnstoff- und 4M Lithiumchlorid-Lösung, so dissoziieren sie in RNA und Protein. Die 50S Untereinheit zerfällt in eine 23S RNA, eine 5S RNA und 32 Proteine; die kleine Untereinheit in eine 16S RNA und 21 Proteine. Die Primärstrukturen aller drei RNAs sind vollständig aufgeklärt. Die 5S RNA, mit 120 Nukleotiden die kleinste, wurde von Brownlee, Sanger und Barrel sequenziert (1968). Bei einer Kettenlänge von 2904 Nukleotiden hat die 23S RNA ein Molekulargewicht von $1,1 \times 10^6$ Dalton. Ihre Primärstruktur wurde 1979 von Brosius et al. bestimmt. Die Sequenz der 16S RNA, die 1541 Nukleotide zählt und ein Molekulargewicht von $5,6 \times 10^5$ Dalton hat, wurde 1978 gleich von zwei Arbeitsgruppen sequenziert (Brosius et al., 1978; Carbon et al., 1978).

Die ribosomalen Proteine können mit Hilfe einer zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und charakterisiert werden (Kaltschmidt und Wittmann, 1970). Die anerkannte Nomenklatur der ribosomalen Proteine basiert auf ihrer Lage im zweidimensionalen Gelelektropherogramm. So werden die Proteine der kleinen (small) Untereinheit als S1 bis S21 bezeichnet. Die Auftrennung der Proteine der großen (large) Untereinheit ergibt 34 Flecken. Die Anfärbung in Position 8 ist ein Proteinkomplex, bestehend aus L7, L12 und L10. L26, das nach Dissoziation der Ribosomen auf beiden Untereinheiten zu finden ist und zwar in einem Verhältnis von 0,8 auf der 30S- und 0,2 auf der 50S-Untereinheit, liegt also pro Ribosom in einer Kopie vor. Da dieses Protein zum größten Teil auf der kleinen Untereinheit verbleibt, bezeichnet man es meist als Protein S20. Somit erklärt sich, daß die 32 Proteine der 50S Untereinheit als L1 bis L34 bezeichnet werden. Die Molekulargewichte der ribosomalen Proteine liegen zwischen 6000 und 30000 Dalton mit Ausnahme von Protein S1, welches ein Molekulargewicht von 61000 Dalton

besitzt. Es konnten die Primärstrukturen aller ribosomalen Proteine von *Escherichia coli* ermittelt werden (Brimacombe et al., 1978; Wittmann et al., 1979; Wittmann, 1982). Von einigen Ausnahmen abgesehen sind die ribosomalen Proteine wegen ihres hohen Anteils an Arginin und Lysin stark basisch.

Wichtig für das exakte Verstehen der Wirkungsweise des Ribosoms sind neben der Kenntnis der Primärstruktur Aufschlüsse über die Sekundärstruktur, Tertiärstruktur und die räumliche Anordnung der Komponenten. Für die RNAs existieren schon mehrere Vorschläge für mögliche Sekundärstrukturen. So wurden für die 16S RNA (vgl. Wittmann, 1982) und die 23S RNA (Glotz et al., 1981) Sekundärstrukturen vorgeschlagen, in denen haarnadelartige Auffaltungen von unterschiedlicher Länge über kurze einzelsträngige Bereiche miteinander verbunden sind. Auch für die 5S RNA von *Escherichia coli* gibt es eine ganze Reihe sehr unterschiedlicher Modellvorstellungen (Erdmann, 1976). Für diese RNA existiert auch ein Tertiärstrukturmodell, das basierend auf Nukleasespaltung der RNA sowie den entsprechenden RNA-Proteinkomplexen entwickelt wurde (Pieler und Erdmann, 1982). Auch für Proteine liegen schon eine Reihe von Vorhersagen möglicher Sekundärstrukturen vor. Diese basieren einerseits auf theoretischen Voraussagen aus den Aminosäuresequenzen und andererseits auf experimentellen Daten von Cirkulardichroismusstudien (Wittmann, 1982). Für einige Proteine existieren auch Informationen über ihre Tertiärstruktur. Mit chemischen und physikalischen Methoden wie z.B. limitierter Proteolyse, Kristallisation von Proteinen mit anschließender Röntgenstrukturanalyse, Fluoreszenzspektroskopie und Mikrokalorimetrie konnte gezeigt werden, daß die meisten Proteine eine kompakte Struktur besitzen und nur einige mehr oder weniger elongiert sind (Wittmann, 1982).

Zur Untersuchung der räumlichen Anordnung im Ribosom gibt es eine Reihe von Methoden, von denen hier nur einige kurz dargestellt werden sollen. Zum einen stehen physikalische Methoden zur Verfügung, wie zum Beispiel die Fluoreszenzspektroskopie oder die Neutronen- bzw. Röntgenkleinwinkelstreuung,

zum anderen geben aber auch einige biochemische Methoden darüber Auskunft. Eine große Rolle spielt hier die sogenannte Quervernetzung. Dazu werden Reagenzien verwendet, die zwei reaktive Gruppen tragen, mit denen sie Proteine mit RNA, RNA mit RNA oder auch Proteine untereinander kovalent verbinden können. Aufgrund der definierten Länge dieser Reagenzien lassen sich dann Nachbarschaften zwischen den einzelnen Komponenten feststellen (Brimacombe et al., 1976; Traut, 1979).

Eine andere Methode zur Untersuchung der räumlichen Struktur stellt die milde Nukleasebehandlung von RNA-Protein-Komplexen dar, mit der man die Bindungsorte ribosomaler Proteine an die RNA bestimmen kann.

Einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der räumlichen Struktur des Ribosoms, sowie der Anordnung der an der Oberfläche liegenden Proteine, hat die Immuielektronenmikroskopie geleistet. Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen einzelne ribosomale Proteine. Die bivalenten IgG-Antikörper verknüpfen zwei Ribosomen bzw. deren Untereinheiten miteinander, indem sie spezifisch an "ihr Protein" binden, sofern sich antigene Determinanten auf der Oberfläche des Ribosoms befinden. Diese Komplexe werden nach Kontrastierung im Elektronenmikroskop untersucht. In der Arbeitsgruppe Stöffler wurden bisher 14 Proteine der 30S Untereinheit und 14 Proteine der 50S Untereinheit lokalisiert. Abbildung 1 zeigt das Modell der 30S- und der 50S-Untereinheit mit den elektronenmikroskopisch ermittelten Positionen der ribosomalen Proteine, wie sie von der Arbeitsgruppe Stöffler vorgestellt worden sind. Ähnliche Untersuchungen wurden von Lake in Zusammenarbeit mit Strycharz und Nomura sowie Kahan und Winckelmann vorgenommen. Sie konnten die Orte von 5 Proteinen auf der 50S und 11 Proteinen auf der 30S Untereinheit bestimmen (Lake, 1981).

Neben der Aufklärung der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur ist es wichtig, die Funktionen einzelner Komponenten

zu untersuchen. Die Rekonstitution von aktiven Ribosomenuntereinheiten aus ihren Bestandteilen ist eine Methode, die dafür sehr geeignet ist. Bisher ist es gelungen, die 30S Untereinheit von *E. coli* (Traub und Nomura, 1968) und die 50S Untereinheiten von *Bacillus stearothermophilus* (Nomura und Erdmann, 1970) und *E. coli* (Nierhaus und Dohme, 1974) zu rekonstituieren. Ebenfalls von Bedeutung ist die partielle Rekonstitution. Bei dieser Methode erzeugt man sogenannte Subpartikel, indem man die Ribosomen bzw. deren Untereinheiten mit Harnstoff oder Salzen wie z.B. LiCl und CsCl behandelt. Man hat nun die Möglichkeit, diese Subpartikeln auf Beeinträchtigung ihrer Funktionalität hin zu untersuchen. Mit den abgespaltenen Proteinen (Splitproteine) können sie wieder zu funktionstüchtigen Partikeln rekonstituiert werden (Hosokawa et al., 1966; Staehelin und Meselson, 1966). So konnte z.B. durch Weglassen der Proteine L7/L12 gezeigt werden, daß diese notwendig sind, um die Elongationsfaktoren an die 50S Untereinheit zu binden. Denn fehlten diese Proteine in der rekonstituierten Untereinheit, so ging die Fähigkeit, diese Faktoren anlagern zu können, verloren, und die 50S Partikel zeigte keine GTPase Aktivität (Kischa et al., 1971; Hamel und Nakamoto, 1972). Wichtige Untersuchungen über die Zusammensetzung des Peptidyltransferasezentrums wurden ebenfalls mit Hilfe der Rekonstitution durchgeführt. Hierauf soll in Abschnitt 1.2.1. auf Seite 11 genauer eingegangen werden.

Eine weitere Methode zur Identifizierung funktioneller Zentren stellt die Affinitätsmarkierung dar, auf die in Abschnitt 1.3. auf Seite 13 näher eingegangen wird. Die Idee, die dieser Methode zugrunde liegt, besteht darin, Liganden, die spezifisch an bestimmte funktionelle Zentren auf dem Ribosom binden, radioaktiv zu markieren und chemisch so zu modifizieren, daß sie mit diesem kovalent verknüpft werden. Anschließend ermöglicht eine Analyse der markierten Komponente eine genaue Bestimmung des Reaktionsortes. Die Affinitätsmarkierung läßt sich auch sehr gut mit der Immunelektronenmikroskopie kombi-

nieren, indem man Antikörper verwendet, die spezifisch gegen den Liganden gerichtet sind und somit eine elektronenmikroskopische Auswertung erlauben.

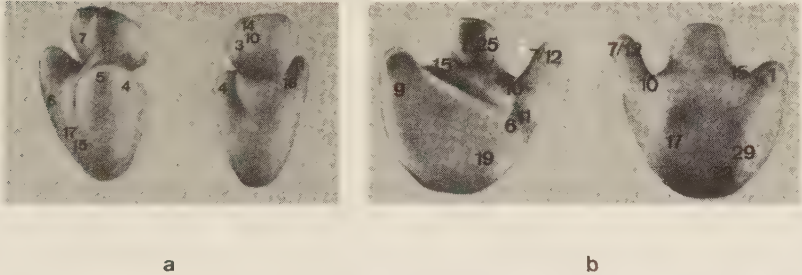


Abbildung 1: Modell der 30S (a) und 50S (b) Untereinheit von *E. coli*. Die Zahlen geben die Bindestellen von Antikörpern gegen isolierte ribosomale Proteine an (Stöffler, persönliche Mitteilung).

1.2. Funktion des Ribosoms

Die Aufgabe des Ribosoms ist die Verknüpfung von Aminosäuren zu Proteinen nach der Information, die in der DNA enthalten ist und von der mRNA übertragen wird. Dieser als Translation bezeichnete Vorgang ist ein komplizierter Prozeß, an dem außer dem Ribosom und der mRNA eine Reihe anderer Faktoren beteiligt sind.

Die transfer RNA (tRNA) ermöglicht eine spezifische Bindung der Aminosäuren an den Ribosomen-mRNA-Komplex. Alle tRNA-Arten enthalten ein CCA-Ende, das wichtig ist für die Beladung der RNA mit ihrer spezifischen Aminosäure. Diese wird an das C-2' oder C-3' des terminalen Adenosins kovalent gebunden. Die Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, sind die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, die jede spezifisch für eine Aminosäure sind.

Die Genauigkeit, mit der ein Protein nach der Information der mRNA synthetisiert wird, ist durch die spezifische Codon-Anticodon-Wechselwirkung und durch die Vielzahl der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, die ihre tRNA und die dazugehörige Aminosäure erkennen, gewährleistet.

Eine Reihe von extraribosomalen Proteinen, die für die Translation benötigt werden, werden je nach ihren Aufgaben als Initiationsfaktoren (IF), Elongationsfaktoren (EF) und Terminations- bzw. Releasefaktoren (RF) bezeichnet. Die Energie, die bei einigen Reaktionen benötigt wird, wird durch die Hydrolyse von GTP geliefert.

a) Initiation

Die Initiation der Proteinbiosynthese beginnt mit der Anlagerung der Faktoren IF1 und IF3 an die 30S Untereinheit (Abbildung 2). Im nächsten Schritt bindet die mRNA mit ihrer Präinitiatorregion (Shine-Dalgarno-Sequenz) in der Nähe des 3'-Endes an die 16S RNA (Shine und Dalgarno, 1974). Dadurch ist gewährleistet, daß eines der beiden Initiationscodone AUG bzw. GUG so an der 30S Untereinheit ausgerichtet ist, daß die Initiator-tRNA an ihr Erkennungstriplett binden kann. Bei Prokaryonten ist diese Initiator-tRNA eine Methionin-tRNA, bei der die Aminogruppe

des Methionins formyliert ist. Sie bindet zusammen mit IF2 und GTP an den mRNA-30S-Komplex. Nach Dissoziation von IF1 und IF3 kommt es zur Anlagerung der großen Untereinheit und damit, nachdem sich auch IF2, GDP sowie anorganisches Phosphat gelöst haben, zur Entstehung eines funktionellen 70S Ribosoms.

Untersuchungen mit Antibiotika zur Bestimmung der Bindestelle der Start-tRNA und der Aminoacyl-tRNA (aatRNA) an das Ribosom zeigten, daß beide tRNA-Arten an funktionell verschiedenen Stellen binden. Der Ort, an dem die aatRNA an das Ribosom gebunden wird, wird als Aminoacylregion (A-site) bezeichnet, während die Start-tRNA an die sogenannte Peptidylregion (P-site) bindet, an die auch die wachsende Peptidkette während der Elongation angelagert wird.

b) Elongation

Bevor eine aatRNA an das Ribosom gebunden werden kann, muß sie mit EF-TuxGTP als sogenannter "ternärer Komplex" vorliegen. Dieser lagert sich unter Energieverbrauch gemäß den Codon-Anticodon-Wechselwirkungen an die ribosomale A-site an, wobei der EF-TuxGDP-Komplex und Orthophosphat freigesetzt werden (Abbildung 2). Danach kommt es unter der katalytischen Wirkung der Peptidyltransferase (vgl. Abschnitt 1.2.1.) zur Ausbildung der Peptidbindung. Die an der P-site verbliebene $\text{tRNA}_f^{\text{Met}}$ dissoziiert nach dieser Reaktion ab.

Im nächsten Schritt, der Translokation, wandert das Ribosom unter Energieverbrauch und mit Hilfe von EF-G auf der mRNA in 3'-Richtung um ein Triplet weiter, so daß das Dipeptid von der A-site zur P-site verschoben wird, und die A-Stelle für die Bindung eines weiteren ternären Komplexes frei wird.

Die Elongation ist ein zyklischer Prozeß, der solange durchlaufen wird, bis an der A-site eines der drei Stopcodone erscheint, die für keine Aminosäure kodieren.

c) Termination

Als Terminationscodone, die das Ende der Proteinbiosynthese anzeigen, dienen UAA, UAG und UGA. Tritt eines dieser Codone in die ribosomale A-site, werden anstatt einer aatRNA Release-

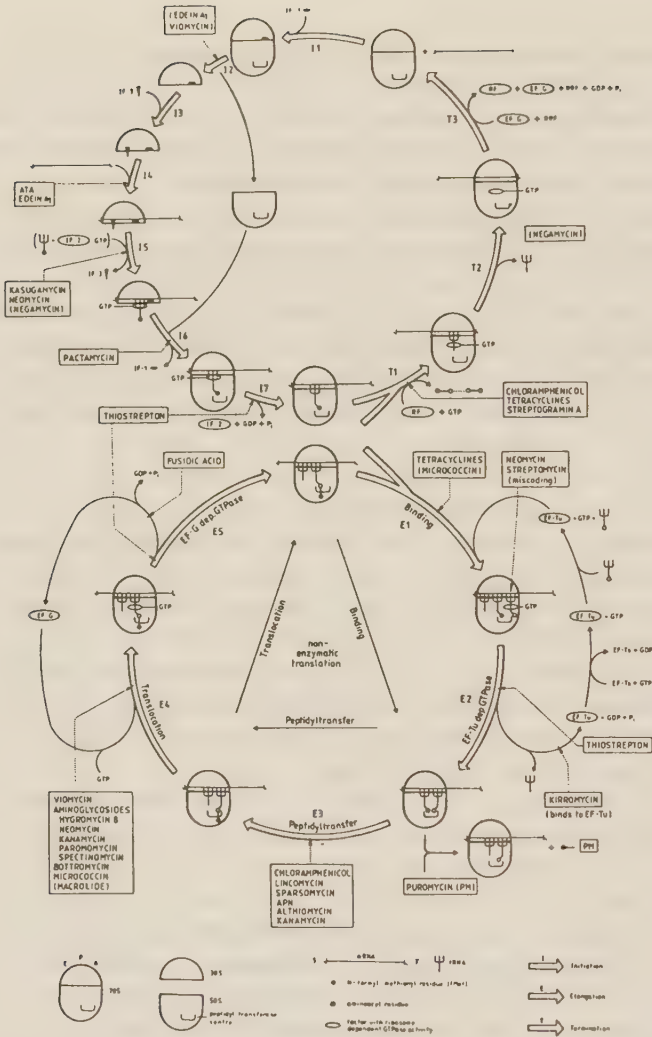


Abbildung 2: Schema der Proteinbiosynthese (nach Nierhaus, 1982).
Zusätzlich sind die wichtigsten Antibiotika eingezeichnet, die auf der Ebene der Translation wirken.

faktoren an das Ribosom gebunden (Abbildung 2). RF1 erkennt UAA und UAG, während RF2 bei Auftreten der Codone UAA und UGA an die ribosomale A-site bindet. Beide Faktoren werden durch RF3, der als einziger Releasefaktor mit GTP und GDP einen Komplex eingehen kann, stimuliert.

Diese Releasefaktoren aktivieren die Peptidyltransferase, die die Esterbindung zwischen der tRNA und der Polypeptidkette hydrolysiert. Nachdem das neu synthetisierte Protein das Ribosom verlassen hat, lösen sich auch die tRNA und die mRNA vom Ribosom, das anschließend in seine Untereinheiten zerfällt und damit bereit ist, erneut an der Synthese eines Proteins teilzunehmen.

1.2.1. Das Peptidyltransferasezentrum

Der Peptidyltransferase kommt bei der Funktion des Ribosoms eine entscheidende Bedeutung zu. Wie im Vorangegangenen beschrieben, katalysiert sie zum einen die Ausbildung der Peptidbindung während der Elongation und zum anderen, in Verbindung mit den Releasefaktoren, die Hydrolyse der Esterbindung zwischen der tRNA und der Polypeptidkette bei der Termination. Bei der Peptidyltransferase handelt es sich um Proteine und RNA, die dem ribosomalen Verband angehören und auf der 50S Untereinheit lokalisiert sind. Da es sich hierbei nicht unbedingt nur um eine einzelne Komponente handelt, sondern um das Zusammenwirken mehrerer ribosomaler Bestandteile, ist es sicherlich korrekter, vom Peptidyltransferasezentrum zu sprechen. Da verschiedene Komponente an diesem System teilhaben, gibt es erhebliche Schwierigkeiten bei der exakten Bestimmung dieses katalytischen Zentrums. Drei Methoden sind hauptsächlich geeignet, diesem Problem näherzukommen. Einmal die Affinitätsmarkierung (vgl. Abschnitt 1.1. S.6. und besonders Abschnitt 1.3. S.13), zum zweiten die partielle bzw. totale Rekonstitution (vgl. Abschnitt 1.1. S.6) und zum dritten

die chemische Modifikation einzelner ribosomaler Komponenten (vgl. Abschnitt 4.5.3.).

Die Affinitätsmarkierung, die bisher eine stärkere Anwendung gefunden hat, ist eine topographische Methode, mit der man die ribosomalen Komponenten am oder in der Nähe des Peptidyltransferasezentrums identifizieren kann. Ergebnisse, die die Affinitätsmarkierung für die Lokalisierung erbracht hat, werden in den nächsten Abschnitten kurz dargestellt.

Zur Bestimmung des Peptidyltransferasezentrums mit Hilfe von Rekonstitutionsexperimenten werden beim Zusammenbau funktioneller Ribosomen spezifisch ribosomale Komponenten fortgelassen und die rekonstituierten, inkompletten Ribosomen untersucht, ob und wie die ribosomale Funktion durch das Fehlen beeinträchtigt ist. Die Schwierigkeit, die sich hierbei ergibt, liegt darin zu unterscheiden, ob durch das Weglassen einzelner Proteine die Funktion des Zentrums direkt beeinflusst wird, oder ob es sich dabei um eine Störung des komplexen Assemblierungsprozesses handelt.

In früheren Arbeiten wurde den Proteinen L6 (Dietrich et al., 1974), L11 (Nierhaus und Montejó, 1973), L16 (Moore et al., 1975) sowie der 5S RNA (Erdmann et al., 1971; Dohme und Nierhaus, 1976) eine bedeutende Rolle bei der Peptidyltransferaseaktivität zuerkannt. Neuere Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe Nierhaus nennen als ribosomale Komponenten, die für die Rekonstitution des Peptidyltransferasezentrums notwendig sind, die Proteine L2, L3, L4, L15 und L16 sowie 23S RNA. Daneben werden noch eine Reihe von Proteinen (L13, L14, L17, L21, L25 und L27) sowie die 5S RNA angegeben (Hampl et al., 1981; Schulze und Nierhaus, 1982), die die Aktivität der Peptidyltransferase stark stimulieren.

In dem Übersichtsartikel von Nierhaus (1979) wird auf die Rekonstitution von E. coli 50S Untereinheiten und des Peptidyltransferasezentrums ausführlich eingegangen.

1.3. Affinitätsmarkierung

Die Affinitätsmarkierung bietet eine Möglichkeit, Komponenten, die am Aufbau funktioneller Zentren beteiligt sind, direkt zu identifizieren. Die Idee besteht darin, daß man das zu untersuchende Zentrum spezifisch substituiert und analysiert. Übertragen auf das Peptidyltransferasezentrum bedeutet das, daß man Substanzen sucht, die hier ihren Wirkungsort haben; das sind zum Beispiel tRNAs und eine Reihe von Antibiotika, die die Proteinbiosynthese an diesem Punkt unterbrechen. Um allerdings das Affinitätsmarkierungsreagens an Komponenten des aktiven Zentrums kovalent zu binden, ist es notwendig, das Reagens mit einer chemisch oder photochemisch reaktiven Gruppe zu versehen. Hierbei ist es wichtig darauf zu achten, daß das Markierungsreagens trotz reaktiver Gruppe seine Bindungseigenschaften an das Substrat nicht verliert, das heißt, daß die reaktive Gruppe so gelegen sein sollte, daß sie mit der Substratbindungsstelle möglichst nicht interagiert. Eine chemisch reaktive Gruppe, die zum Beispiel an tRNAs gekoppelt wird, ist der N-(Nitrophenoxycarbonyl)rest, der eine aktive Esterbindung enthält, die durch nukleophile Substitution gespalten werden kann (Burton und Hartley, 1970). Diese Gruppe reagiert vornehmlich mit der ϵ -Aminogruppe des Lysins (Collatz et al., 1976).

Die Haloacylreste, die sowohl an tRNAs als auch an Antibiotika gebunden werden, reagieren bevorzugt mit Mercaptogruppen. Diese Tatsache, daß beide reaktiven Gruppen mit unterschiedlichen Substituenten reagieren, bringt sicherlich auch ein unterschiedliches Markierungsmuster mit sich, was man bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigen muß.

Zur Photoaffinitätsmarkierung eignen sich als reaktive Gruppen zum Beispiel Azide oder Diazoacetyl-Verbindungen. Puromycin allerdings kann auch ohne Einführung einer photochemischen Gruppe für die Affinitätsmarkierung verwendet werden. Dieses

Antibiotikum wird bei Licht einer Wellenlänge von 253,7 nm an die Ribosomen gebunden (Cooperman et al., 1975, Jaynes et al., 1978). Die Photoaffinitätsreagenzien haben allerdings häufig den Nachteil, daß sie gegenüber dem chemischen Reagens eine geringere Einbaurrate besitzen.

Für beide Arten der Markierung ist es wichtig, ein radioaktives Atom (^3H , ^{14}C) einzuführen, um die anschließende Identifizierung des Bindungsortes möglich zu machen.

Zur Affinitätsmarkierung des Peptidyltransferasezentrums auf der großen Untereinheit des Ribosoms wurden in dieser Arbeit Antibiotika verwendet, die auf chemischem Wege mit dem aktiven Zentrum reagierten.

Ausführliche Übersichtsartikel über Affinitätsmarkierungen von E. coli Ribosomen findet man bei Pellegrini und Cantor, (1977) und Cooperman (1979).

1.4. Antibiotika

Unter der Bezeichnung Antibiotika versteht man Substanzen, die das Wachstum und die Entwicklung von Mikroorganismen bzw. Zellen höherer Lebewesen hemmen. Es handelt sich hierbei um eine chemisch völlig heterogene Gruppe von Stoffen, deren einzige Gemeinsamkeit ist, daß sie von Bakterien oder Pilzen synthetisiert werden und ein Molekulargewicht von unter 2000 Dalton besitzen. Ebenso wie sie chemisch völlig verschiedenartig sind, unterbinden sie das Wachstum von Zellen auch auf ganz unterschiedliche Art und Weise. So wirken die Penicilline beispielsweise über die Hemmung der Zellwandsynthese vornehmlich gram-positiver Bakterien. Andere Antibiotika wirken auf einen Schritt bei der Replikation (z.B. Nalidixinsäure) oder der Transkription wie Actinomycin D. Die weitaus größte Gruppe der bisher bekannt gewordenen Antibiotika hemmt in irgendeiner Weise einen Teilschritt der Translation. Abbildung 2 (Seite 10) zeigt das Translationsschema mit den Wirkungsstellen einiger Antibiotika. Chloramphenicol und Lincomycin sind zum Beispiel zwei Substanzen, die die Peptidyltransferase hemmen. Hingegen nimmt Puromycin in der Reihe der Antibiotika eine Sonderstellung ein, da es eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem endständigen Aminoacyladenosinteil der tRNA besitzt und selbst mit der wachsenden Peptidkette eine Peptidbindung am Ribosom eingeht.

Affinitätsanaloge aller drei Antibiotika wurden zur spezifischen Markierung des Peptidyltransferasezentrums eingesetzt. Im Folgenden soll auf Puromycin und Chloramphenicol etwas spezieller eingegangen werden. Ausführliche Artikel über Antibiotika, die auf der Ebene der Translation wirken, findet man bei Vázquez (1978) und Cundliffe (1979).

1.4.1. Puromycin und seine Affinitätsanaloge

Die große Bedeutung des Puromycins liegt nicht in seiner medizinischen Anwendbarkeit, sondern in seinem Nutzen bei Untersuchungen zur Entstehung von Peptidbindungen und der Wirkungsweise anderer Antibiotika auf die Translation. Da Puromycin (Abbildung 3a) ein Analog des 3'-Endes der Aminoacyl-tRNA ist, bindet es wie diese an die A-site des Peptidyltransferasezentrums auf der großen Untereinheit sowohl prokaryontischer als auch eukaryontischer Ribosomen. Das Puromycin ist mit seiner Aminogruppe in der Lage, mit der Acylgruppe des endständigen Aminoacyladenosinteils der Peptidyl-tRNA eine Peptidbindung zu bilden ("Puromycinreaktion"). Da die C-N-Bindung zwischen dem p-Methoxyphenylalanin und dem Nukleosidrest äußerst stabil ist, kann keine weitere Peptidbindung eingegangen werden. Das Peptidylpuromycin wird vom Ribosom abgespalten. Es konnte gezeigt werden, daß die Bildung dieser Peptidbindung nach dem gleichen Mechanismus abläuft wie bei der Proteinbiosynthese (Traut und Monro, 1964).

Untersuchungen, in denen verschiedene Puromycinanaloge auf ihre Wirksamkeit in der Puromycinreaktion getestet wurden, ergaben, daß der Benzolring im Aminosäureteil äußerst wichtig ist. Ersetzt man das p-Methoxyphenylalanin zum Beispiel durch Tryptophan, Prolin oder aliphatische Aminosäuren, ist eine deutliche Aktivitätsabnahme zu verzeichnen. Andererseits ist die Aktivität nur wenig reduziert, wenn S-Benzyl-L-Cystein den Aminosäureanteil bildet. Welche Bedeutung dem Benzolring allerdings zukommt, ist bis heute unklar geblieben (Franklin und Snow, 1973).

Um die ribosomalen Komponenten zu untersuchen, die mit Puromycin interagieren, wurden Affinitätsmarkierungsexperimente mit Puromycin selbst und verschiedenen Derivaten durchgeführt. Symons und Mitarbeiter synthetisierten das 5'-O-(N-bromacetyl-p-aminophenylphosphoryl)-3'-N-L-phenylalanylpuromycin, kurz BAP-Pan-Phe genannt (Abbildung 3b) (Harris et al., 1973).

Dieses Puromycinanalog bindet hauptsächlich an die 23S RNA (Greenwell et al., 1974). Ein anderes Derivat stellten Pongs und Mitarbeiter 1973 her, das N-Jodacetylpuromycin (Abbildung 3c). Anders als beim BAP-Pan-Phe befindet sich bei diesem die chemisch reaktive Gruppe nicht an der Ribose sondern an der Aminogruppe des Methoxyphenylalanins. Deshalb kann man es als reaktives Analog einer N-Acetylaminoacyl-tRNA betrachten, die in die P-site des Peptidyltransferasezentrums bindet (Wischnath et al., 1976). Ribosomen, die mit einem 30fachen Überschuß an N-Jodacetylpuromycin bei 37°C für zwei Stunden in TMA I-Puffer

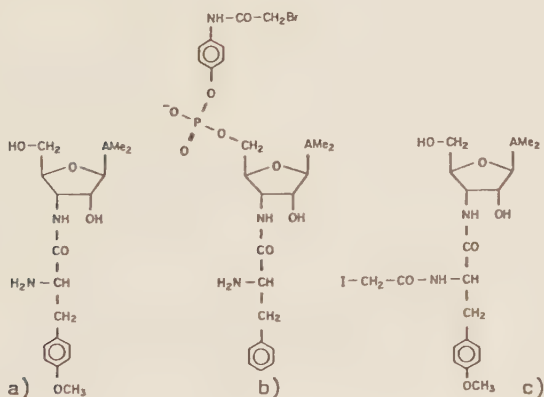


Abbildung 3: Struktur von Puromycin (a), sowie den beiden chemischen Affinitätsanalogen BAP - Pan - Phe (b) und N-Jodacetylpuromycin (c).

(vgl. Material und Methoden Abschnitt 3.1.1.) inkubiert wurden, zeigten in der in vitro durchgeführten Poly-Uridin abhängigen Poly-Phenylalanin-Synthese nur noch ungefähr 40% ihrer ursprünglichen Aktivität. Auch eine intensive Dialyse gegen den Reaktionspuffer brachte keinen Aktivitätsgewinn. In einem zweiten Versuch, in dem diesem Reaktionsansatz Puromycin in einem großen Überschuß zugegeben wurde, zeigte sich, daß das Affinitätsmarkierungsreagens mit dem Puromycin in Konkurrenz trat und nur noch zu 60% gebunden wurde (Pongs et al., 1973). Diese beiden Experimente bestätigten zum einen, daß dieses Puromycinderivat spezifisch bindet und wirkt, und zum anderen, daß es kovalent an das Ribosom gebunden wird. Pongs und Mitarbeiter fanden als Hauptmarkierungsprotein L6 und zu einem kleinen Teil L2. In dieser Arbeit wurde als Affinitätsmarkierungsreagens N-Bromacetylpuromycin verwendet, das ebensolche Eigenschaften aufweist wie das oben beschriebene Analoge.

Neben diesen beiden chemischen Markierungsreagenzien existieren noch drei Substanzen zur Photoaffinitätsmarkierung. Und zwar kann das Puromycin ohne Einführung einer photochemischen Gruppe benutzt werden (Jaynes et al., 1978). Außerdem gibt es noch die Derivate N-Ethyl-2-diazomalonyl-Puromycin (Jaynes et al., 1978) und p-Azido-Puromycin (Nicholson und Coopermann, 1978; Krassnigg et al., 1978). Die Ergebnisse mit diesen Reagenzien sind in Tabelle 1 im Vergleich mit den chemischen Markierungsreagenzien dargestellt.

Reagens	markierte ribosomale Komponente	Referenz
Puromycin (P)	L23, S14, 50S RNA	Jaynes et al., 1978
p-Azido-Puromycin (P)	L11, S18 (H) L2, L3, L17, L18, L27, S3, S4, S5 (N)	Nicholson und Cooperman, 1978
p-Azido-Puromycin (P)	L6, L13, L18, L22, L25 (H) L11, L23, L27, L30 (N)	Krassnigg et al., 1978
p-Azido-Puromycin (P)	L23, L18/22, S18 (H) L15, S7, S14 (N)	Nicholson et al., 1982
N-Äthyl-2-diazomalo- nylpuromycin (P)	S18, S14	Jaynes et al., 1978
N-Jodacetyl- puromycin (C)	L6 (H) L2 (N)	Pongs et al., 1974
BAP-Pan-Phe (C)	23S RNA	Greenwell et al., 1974

P = Photoaffinitätsmarkierungsreagens

C = Chemisches Affinitätsmarkierungsreagens

H = Hauptmarkierungsproteine

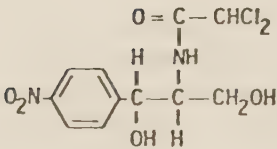
N = Nebenproteine

Tabelle 1: Ergebnisse der Affinitätsmarkierungen mit Puromycin
und seinen Analogen.

1.4.2. Chloramphenicol und seine Affinitätsanalogen

Chloramphenicol hat eine relativ einfache chemische Struktur (Abbildung 4). Es ist das bekannteste Antibiotikum, das die Peptidyltransferasereaktion hemmt. Seine antibiotische Wirkung ist allerdings im Gegensatz zu der des Puromycins auf 70S Ribosomen beschränkt. Der molekulare Mechanismus dieses Antibiotikums ist noch nicht gänzlich geklärt. Wahrscheinlich hemmt Chloramphenicol die Bindung des Aminoacylrestes an das Peptidyltransferasezentrum, wobei aber die Bindung der Aminoacyl-tRNA an die A-site unbeeinflusst bleibt.

Abbildung 4: Struktur des Chloramphenicols.



Als Affinitätsanaloge eignen sich Monobromamphenicol (Sonenberg et al., 1973) und Monojodamphenicol (Pongs et al., 1973). Sonenberg et al. fanden L2 und L27 als Hauptmarkierungsproteine von (¹⁴C)-Monobromamphenicol, während Pongs und Mitarbeiter für (¹⁴C)-Monojodamphenicol neben L6 und L24 am stärksten L16 in der 50S Untereinheit markiert erhielten. Obwohl sich die beiden Affinitätsanalogen sehr ähnlich sind, kommen beide Arbeitsgruppen zu völlig unterschiedlichen Ergebnissen. Sie verwendeten zur Identifizierung der markierten ribosomalen Komponenten lediglich die zweidimensionale Poly-

acrylamidgelelektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann, indem sie die aufgetrennten Proteinflecken mit ihrer Umgebung aus- schnitten und im Szintillationszähler zählten. Ob diese Methode zur Untersuchung affinitätsmarkierter Proteine geeignet ist, ist allerdings fraglich, wie diese großen Unterschiede in den Ergebnissen zeigen.

In der vorliegenden Arbeit jedenfalls wurden andere Methoden verwendet, um die affinitätsmarkierten Proteine zu identifi- zieren. Darüber soll in den Abschnitten 4.4.1.1. - 4.4.1.5. noch ausführlich diskutiert werden.

2. PROBLEMSTELLUNG

Die Hauptaufgabe dieser Arbeit war es, die mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin affinitätsmarkierten Komponenten der isolierten 50S Untereinheit zu identifizieren. Um Anhaltspunkte zu bekommen, ob es sich bei den Proteinen um wirkliche Affinitätsmarkierungen handelt oder eventuell um zufällige Alkylierungsreaktionen, wurden zur Kontrolle zum einen 50S Untereinheiten mit (^{14}C)-Jodacetamid, einem reinen Alkylierungsreagens, zum anderen isolierte ribosomale Proteine (TP50) mit dem Affinitätsmarkierungsreagens umgesetzt.

Da die meisten beschriebenen Affinitätsmarkierungsexperimente an 70S Ribosomen vorgenommen und somit auch die Bindungsproteine auf der 30S Untereinheit untersucht wurden, war es interessant festzustellen, ob auch 30S Proteine aufgrund ihrer Nähe zum Peptidyltransferasezentrum modifiziert werden. Außerdem sollte an 70S Ribosomen nachgeprüft werden, ob hier dieselben Proteine markiert werden, wie in der isolierten 50S Untereinheit.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden Affinitätsmarkierungsexperimente an 50S Untereinheiten mit (^{14}C)-Jodamphenicol durchgeführt, und die markierten Komponenten mit denen verglichen, die man mit dem Puromycinanalogon gefunden hatte.

Untersuchungen zur Affinitätsmarkierung der 50S Untereinheiten von *Bacillus stearothermophilus* beschließen die Arbeit.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Standardpuffer, Lösungen, Material und Geräte

3.1.1. Standardpuffer und Lösungen

TMA I 10 mM Tris-HCl, pH 7,8 (23°C)
 10 mM Magnesiumacetat
 100 mM Ammoniumchlorid

Puffer I 60 mM Ammoniumchlorid
 20 mM Tris-HCl pH 7,4 (23°C)
 10 mM Magnesiumacetat
 10 mM 2-Mercaptoethanol

Puffer II 1.1 M Saccharose (RNasefrei)
 0,5 M Ammoniumchlorid
 10 mM Magnesiumacetat
 50 mM Tris-HCl pH 7,4 (23°C)
 10 mM 2-Mercaptoethanol

Zonal- 0,7 mM Magnesiumacetat
puffer I 100 mM Ammoniumchlorid
 20 mM Tris-HCl pH 7,4 (23°C)
 10 mM 2-Mercaptoethanol

Zonalpuffer II wie Zonalpuffer I, jedoch mit 40% Saccharose

TEB-Puffer 80 mM Tris-HCl pH 7,4 (23°C)
 100 mM Borsäure
 2 mM Na₂EDTA

5% Acrylamid-Lösung in TEB-Puffer
 5% Acrylamid
 0,2% Bisacrylamid

3% Saccharose
0,05% TEMED
0,03% Ammoniumperoxodisulfat

Frontmarker für die Polyacrylamidgelelektrophorese
0,1% Bromphenolblau in TEB-Puffer (Saccharose
gesättigt)

RNA-Gelfärbelösung 0,1% Toluidinblau in 1% Essigsäure

Mikro 2-D Elektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann

	<u>Unteres 5% Gel</u>	<u>4% Proben gel</u>
Harnstoff	18,0 g	24,0 g
Acrylamid	2,5 g	2,0 g
Bisacrylamid	0,09 g	0,1 g
Na ₂ EDTA	0,4 g	0,043 g
Borsäure	1,6 g	0,16 g
Tris	2,4 g	-
TEMED	0,15 ml	0,03 ml
Wasser	auf 49,5 ml	auf 49,5 ml

	<u>Oberes 10% Gel</u>	<u>Puffer</u>
Harnstoff	18,0 g	770,0 g
Acrylamid	5,0 g	-
Bisacrylamid	0,19 g	-
Na ₂ EDTA	0,4 g	4,8 g
Borsäure	1,6 g	19,2 g
Tris	2,4 g	29,1 g
TEMED	0,15 ml	-
Wasser	auf 49,5 ml	auf 2l

5 mg Ammoniumperoxodisulfat in 1ml Riboflavinlösung (0,5 mg/ml)

<u>2. Dimension</u>	<u>Bodengels</u>	<u>Trenngels</u>
Harnstoff	210,0 g	105,0 g
Acrylamid	145,0 g	52,5 g
Bisacrylamid	3,65 g	1,35 g
Essigsäure	30,4 ml	15,2 ml
5N Kalilauge	5,6 ml	2,8 ml
TEMED	3,38 ml	1,7 ml
Wasser	564,0 ml	282,0 ml

Puffer 70 g Glycin
 15 ml Essigsäure
 5 l Wasser

	<u>Färbelösung</u>	<u>Entfärbelösung</u>
Coomassieblau	1,0 g	-
Methanol	500,0 ml	2,0 l
Essigsäure	75,0 ml	750,0 ml
Wasser	425,0 ml	7,25 l

Gellösungen und Elektrodenpuffer für die 1. Dimension der Elektrophorese nach Geyl et al.

Gellösung	4,0 g Acrylamid	} pH-Wert auf 5,0 bringen und auf 100 ml auffüllen
	0,1 g Bisacrylamid	
	1,19 g Bis-Tris	
	36,0 g Harnstoff	
	0,2 Na ₂ EDTA	

Oberer Elektrodenpuffer	20,9 g Bis-Tris	} Vor Gebrauch 1 : 10 verdünnen
	45,0 Essigsäure	
	auf 1000 ml Wasser auffüllen	

Unterer Elektrodenpuffer	175,7 g Kaliumacetat	} Vor Gebrauch 1 : 10 verdünnen
	49,0 ml Essigsäure	
	auf 1000 ml Wasser auffüllen	

Protein- 36 g Harnstoff
lösungs- 1 ml 1M Dithiothreitol
puffer 10 ml oberer Elektrodenpuffer (10x)
30 Tropfen basisches Fuchsin (0,5 mg/ml)
auf 100 ml Wasser auffüllen

Zelluloseacetatgelelektrophorese

Puffer D 0,1 M Tris
0,1 M Bicin pH 8,8
0,05 M 2-Mercaptoethanol
8 M Harnstoff

Puffer E 0,07 M Bis-Tris
0,07 M MES
0,05 M 2-Mercaptoethanol
8 M Harnstoff

Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony

Stamm-puffer 23,54 g Natrium-Veronal
15,54 g Natriumacetatx3 H₂O
20,0 g Cialit
280 ml 0,1N HCl
1560 ml Wasser

Puffer zum 1 M Kaliumchlorid
Wässern 0,01 Tris pH 7,4-7,8
1 g Cialit^R
10 l Wasser

PBS-Puffer 20 mM Kaliumphosphat pH 7,8
0,9% Natriumchlorid

3.1.2. Material und Geräte

Alcoa 305, Serva

DNase I (RNase frei), Serva

Puromycin, Serva

1-(¹⁴C)-Bromessigsäure, Amersham/Buchler

(¹⁴C)-Jodacetamid, Amersham/Buchler

N-Hydroxysuccinimid, Fluka

Cialit^R, Asid

Celluloseacetatgele, Chemotron (Cellogel, Italien)

Bis - Tris, Sigma

MES, Sigma

Agarose, reinst, Serva

Alle übrigen Chemikalien von Merck

Röntgenfilme Kodak XR-5

Microzone^R Electrophoresis cell, Model R - 101, Beckman

3.2. Präparation von Ribosomen und deren Untereinheiten

3.2.1. Präparation von Ribosomen und deren Untereinheiten aus Escherichia coli-Zellen

Die Präparation der Ribosomen erfolgte nach der Methode von Noll (1973) mit einigen Modifikationen nach Lührmann (1976). 50g tiefgefrorener E. coli MRE 600-Zellen wurden bei 4°C mit der doppelten Menge Alcoa 305 in einem vorgekühlten Mörser zerrieben, bis eine homogene Paste entstand. Dieser wurden insgesamt 100 ml Puffer I, der 500 µg DNase I (RNasefrei) enthielt, in kleinen Portionen zugegeben. Das Aufreiben dauerte ca. 20 Minuten. Die Suspension wurde 30 Minuten in einer Sorvall-Zentrifuge bei 10000 UpM zentrifugiert. Zur Abtrennung von Zellpartikeln wurde dieser Überstand ein weiteres Mal für eine Stunde bei 18000 UpM zentrifugiert. Von diesem sogenannten "S30 Überstand" schichtete man zur Isolierung und gleichzeitigen Reinigung der 70S Ribosomen je 15 ml auf ein Zuckerkissen von 8 ml Puffer II in 26 ml fassende Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen und zentrifugierte in einem 60 Ti-Rotor für 20 Stunden bei 35000 UpM. Der "S100 Überstand" wurde dekantiert, und das klare Ribosomensediment vorsichtig zweimal mit destilliertem Wasser gespült, wobei darauf zu achten war, daß die bräunliche Haut, die in einigen Fällen das Sediment bedeckte, dabei abgewaschen wurde. Zur Weiterverarbeitung in "tight couples" wurden die 70S Ribosomen mit wenig Puffer I überschichtet und bei 0°C so lange stehengelassen, bis sie sich vollständig gelöst hatten. Um sie von festen Bestandteilen zu befreien, wurde die Ribosomensuspension kurz für 15 Minuten bei 20000 UpM zentrifugiert. Im Anschluß daran wurde eine Zonalzentrifugation nach Eikenberry et al. (1970) durchgeführt. Man baute einen 6-38% Saccharosegradienten in Puffer I auf und belud ihn mit 8000-10000 A₂₆₀-Einheiten der Ribosomensuspension. Die Dauer des Zonallaufs betrug zur Herstellung der tight couples bei 21000 UpM 16 Stunden.

Zur Auftrennung der 70S Ribosomen in ihre Untereinheiten wurde in ähnlicher Weise verfahren. Nur wurden die sedimentierten Ribosomen in Zonalpuffer (verringerte Mg^{2+} -Ionenkonzentration) aufgenommen, bevor man sie für 16 Stunden bei 25000 UpM einer Zonalzentrifugation in Zonalpuffer unterzog. Anschließend wurden die Gradienten ausgepumpt, die Fraktionen, welche die tight couples bzw. Untereinheiten enthielten, gesammelt und im Falle der Untereinheiten die Magnesiumkonzentration mit Magnesiumacetat wieder auf 10mM gebracht. Zur Konzentrierung und Entfernung der Saccharose wurden die Lösungen für 19 Stunden bei 40000 UpM im 45 Ti-Rotor zentrifugiert und die Sedimente in wenig Puffer I gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurden die 70S tight couples und die 50S bzw. 30S Untereinheiten bei $-80^{\circ}C$ aufbewahrt.

3.2.2. Anzucht von *Bacillus stearothermophilus*

Nährmedium: 10g Trypton
 5g Hefeextrakt
 5g Natriumchlorid
 5g Glukose
 50mg Manganchlorid

Alle Angaben beziehen sich auf ein Liter Medium.

In einem Giovanola-Fermenter wurden 50 l Nährmedium ohne Glukose eine Stunde lang sterilisiert. Die Glukoselösung wurde getrennt davon für 20 Minuten autoklaviert und zu dem Nährmedium hinzugegeben. Zum Animpfen nahm man 1 Liter einer Vorkultur, die über Nacht bei $61^{\circ}C$ gewachsen war.

Das Wachstum der *B. stearothermophilus* Zellen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 650 nm verfolgt. Bei einer Absorption von 0,6-0,8 wurden die Zellen geerntet. Man kühlte die Bakterien auf $4^{\circ}C$ herunter und zentrifugierte sie in einer Padberg-Durchlaufzentrifuge ab. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Zellen bei $-30^{\circ}C$ aufbewahrt.

Abbildung 5 Aufarbeitung von Ribosomen

E. coli : 50 g Zellen + 100 g Alcoa 305

B. stearo: 80 g Zellen + 160 g Alcoa 305

Zerreiben, bis homogene Paste entsteht, portionsweise 100 ml Puffer I (+5 µg DNase/ml) zugeben. (20 min.)

Zentrifugation

30 min. bei 10000 UpM, 4°C

E. COLI

Sediment verwerfen

Überstand

B. STEARO.

Sediment

+100 ml Puffer I

Zentrifugation

30 min, 10000 UpM

Überstand

Überstand

Sediment verwerfen

Zentrifugation

1 Stunde, 18000 UpM

S30 Überstand

Sediment verwerfen

Je 15 ml S30 auf 8 ml Puffer II geben

Zentrifugation

20 Stunden, 35000 UpM

Überstand

Enzymfraktion

70S Ribosomen

aufnehmen in Zonalpuffer

aufnehmen

in Puffer I

Zonalzentrifugation

Zonalzentrifugation

70S tight couples

30S

50S Untereinheiten

3.2.3. Präparation von Ribosomen und deren Untereinheiten aus Bacillus stearothermophilus-Zellen

Um ähnliche Mengen an *B. stearothermophilus* Ribosomen zu erhalten wie von *E. coli*, benötigte man ca. 80 g Zellen. Bis zur Zonalzentrifugation wurde die Präparation so durchgeführt, wie es für *E. coli*-Zellen in Abschnitt 3.2.1. dargestellt worden ist mit der einen Ausnahme, daß das Sediment, bestehend aus Alcoa 305 und den zerriebenen Zellen, einmal mit 100 ml Puffer I nachgewaschen wurde (vgl. Abbildung 5).

Während die Ribosomen-Untereinheiten aus *E. coli*-Zellen nach der Zonalzentrifugation zur Konzentrierung herunterzentrifugiert worden sind, fällte man die ribosomalen Untereinheiten von *B. stearothermophilus* nach der Methode von Expert-Besancon et al. (1974). Dazu versetzte man die Lösung mit 10% Polyäthylenglycol 6000 (Merck) und rührte sie für eine Stunde unter Eiskühlung. Die ausgefallenen Untereinheiten wurden abzentrifugiert (45 Minuten, 10000 UpM, 4°C), in wenig TMA I-Puffer (+10 mM 2-Mercaptoethanol) gelöst und gegen diesen dialysiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Untereinheiten bei -80°C aufgehoben.

3.3. Synthese von N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin

Die Synthese von N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin wurde in Anlehnung an die Methode von Pongs et al. (1973) durchgeführt.

20 μM 2-(^{14}C)-Bromessigsäure wurden mit 22 μM N-Hydroxysuccinimid und 22 μM Dicyclohexylcarbodiimid in 100 μl wasserfreiem Dioxan bei 37°C inkubiert. Nach 90 Minuten zentrifugierte man den dabei ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff herunter und nahm den Überstand vorsichtig ab. Der ausgefallene Harnstoff wurde einmal mit 50 μl Dioxan gewaschen und beide Überstände miteinander vereinigt. Der entstandene 2-(^{14}C)-Bromessigsäuresuccinimidester wurde zu 20 μM Puromycin/HCl in 400 μl 0,4 M NaHCO_3 (pH8)/20% Methanol zugegeben und für zwei Stunden auf einem Vortex-Schüttler bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Produkt wurde anschließend auf einer Aluminiumoxyd-Dünnschichtplatte aufgetrennt. Als Fließmittel diente Dichlormethan/Methanol (95/5). Nachdem die Lösungsmittelfront das obere Ende der Platte erreicht hatte, wurde das N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin ausgestochen, gesammelt und mit 100 ml Dichlormethan/Methanol (50/50) eluiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotavapor bis zur Trockene abgedampft, und das Reagens in wenig Methanol aufgenommen. Bis zu seiner Verwendung wurde das N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin bei -20°C aufbewahrt.

3.4. Umsetzung von 30S-, 50S Untereinheiten, 70S Ribosomen und isolierten Proteinen der 50S Untereinheit

3.4.1. Umsetzung von 30S-, 50S Untereinheiten und 70S Ribosomen mit N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycin

Die Umsetzung von Ribosomen und deren Untereinheiten mit dem Affinitätsmarkierungsreagens N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycin wurde sowohl für *E. coli* als auch für *B. stearo.* nach der gleichen Methode durchgeführt. Zur Entfernung des 2-Mercaptoethanols dialysierte man die Ribosomenlösung (bzw. deren Untereinheiten) dreimal zwei Stunden gegen 500 ml TMA I-Puffer.

2 nM der Ribosomen (bzw. deren Untereinheiten) wurden mit 100 nM N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycin bei 37°C in 2 ml TMA I-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde nach zwei Stunden durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol auf eine Konzentration von 10 mM gestoppt. Zur Abtrennung des nicht reagierten N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycin von den Ribosomen zentrifugierte man die Lösung durch ein 10% Saccharose-TMA I-Pufferkissen, das 10 mM 2-Mercaptoethanol enthielt (4,5 Stunden, 45000 UpM, Ti 50-Rotor). Das Sediment wurde in 500 µl TMA I-Puffer (mit 5mM 2-Mercaptoethanol) gelöst und anschließend dreimal für je drei Stunden gegen 500 ml desselben Puffers dialysiert.

Der Umsatz wurde durch Messung der Radioaktivität (cpm) nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{cpm} \times 100}{\text{Zählausbeute} \times \text{spez. Aktivität} \times 2,2} = \text{pMol}$$

3.4.2. Umsetzung von isolierten Proteinen mit N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycin

Für die Umsetzung von isoliertem Protein der 50S Untereinheit (TP 50) von *E. coli* (Methode der Essigsäureextraktion vgl.

Abschnitt 3.5. S. 34) mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpurumycin wurden 2,5 mg Protein, was etwa 4,6 nM entspricht, mit der 50fachen Menge an N-Brom-(^{14}C)-acetylpurumycin in 3 ml TMA I inkubiert. Um alle ribosomalen Proteine in Lösung zu bringen, war eine Zugabe von 600 μl 8M Harnstoff erforderlich. Im weiteren Verlauf wurde so verfahren, wie es in Abschnitt 3.4.1. beschrieben ist, mit der einen Ausnahme, daß nach Abschluß der Reaktion zur Abtrennung des nicht reagierten Affinitätsmarkierungsreagens anstelle der Zentrifugation eine ausgiebige Dialyse (10x gewechselt) gegen je 500 ml TMA I/5 mM 2-Mercaptoethanol-Puffer vorgenommen wurde.

3.4.3. Umsetzung von 50S Untereinheiten mit (^{14}C)-Jodacetamid

Die Umsetzung von 50S Untereinheiten mit (^{14}C)-Jodacetamid wurde genauso durchgeführt, wie es in Abschnitt 3.4.1. beschrieben ist. Lediglich das molare Verhältnis zwischen 50S Untereinheiten und dem Reagens wurde geändert und betrug in diesem Fall 1 : 10.

3.4.4. Umsetzung von isolierten Proteinen mit (^{14}C)-Jodacetamid

Bei der Reaktion zwischen den isolierten 50S Proteinen und dem (^{14}C)-Jodacetamid wurde genauso verfahren wie bei der Umsetzung mit dem Affinitätsmarkierungsreagens N-Brom-(^{14}C)-acetylpurumycin in Abschnitt 3.4.2.. Allerdings wurde das (^{14}C)-Jodacetamid nur in einem 10fachen Überschuß zugegeben.

3.5. Essigsäureextraktion von Ribosomen und ihren Untereinheiten

Im Anschluß an die Umsetzung der Ribosomen bzw. ihrer Untereinheiten mit dem Markierungsreagens wurde zur Isolierung der Proteine eine Essigsäureextraktion vorgenommen (Waller und Harris, 1961; Sherton und Wool, 1972). Dazu erhöhte man die Magnesiumionenkonzentration in der Lösung mit Magnesiumacetat auf 100 mM und versetzte sie mit dem doppelten Volumen Eisessig. Dieses Gemisch wurde für zwei Stunden auf Eis gerührt. Anschließend zentrifugierte man die ausgefallene RNA in einer Sorvall-Zentrifuge 15 Minuten bei 10000 UpM ab. Um alle Proteine quantitativ zu gewinnen, war es unbedingt erforderlich, die sedimentierte RNA zweimal mit dem Essigsäureextraktionsgemisch nachzuwaschen. Alle Überstände wurden vereinigt und zuerst dreimal gegen 250 ml 10% Essigsäure und anschließend sechsmal gegen je 250 ml 1% Essigsäure dialysiert, wobei dem ersten Dialysepuffer 0,2 mM Na₂EDTA zugegeben wurde. Die Menge des umgesetzten Reagens konnte wieder durch Messung der Radioaktivität (cpm) nach der in Abschnitt 3.4.1. gezeigten Formel errechnet werden. Die Proteine wurden gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert.

Die sedimentierte RNA suspendierte man in wenig bidestilliertem Wasser und brachte die Wasserstoffionenkonzentration mit 1N NaOH auf pH8. Die so gelöste RNA wurde dreimal drei Stunden gegen bidestilliertes Wasser dialysiert, und das gebundene Reagens ebenfalls durch Radioaktivitätsmessung bestimmt. Anschließend wurde die RNA gefriergetrocknet und bis zur weiteren Analyse bei -20°C aufbewahrt.

3.6. RNA-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die isolierte RNA der affinitätsmarkierten 50S Untereinheit sowohl von *E. coli* als auch von *B. stearothermophilus* wurde mit einer Plattengelelektrophorese in einer Kammer nach Studier (1973) aufgetrennt und anschließend autoradiographisch untersucht.

Zwischen zwei Glasscheiben (14 cm x 16 cm), die durch Abstandhalter voneinander getrennt waren und durch Klammern zusammengehalten wurden, füllte man eine Lösung zur Herstellung eines 5% Polyacrylamidgels bis zum oberen Rand und steckte einen Taschenformer zwischen die Glasscheiben, der acht 13 mm breite Plätze für die aufzutragenden Proben formte. Nach dem Erstarren des Gels entfernte man ihn, stellte das Gel in die Elektrophoresekammer, füllte beide Pufferbehälter mit TEB-Puffer auf und schloß die Kammer zu einem einstündigen Vorlauf (10 mA) an das Netzgerät an.

Währenddessen wurden pro Tasche 15 A₂₆₀-Einheiten der mit N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycin umgesetzten ribosomalen RNA in möglichst wenig TEB-Puffer gelöst. Bevor man die Probe auf das Gel auftrug, versetzte man sie mit der gleichen Menge an Saccharose gesättigtem TEB-Puffer. Als Frontmarkierung diente Bromphenolblau. Nach Beendigung des Vorlaufs wurde die RNA mit einer dünnen Kapillare vorsichtig auf das Gel aufgetragen. Zur Kontrolle wurden neben die zu untersuchenden Proben je 0,1 A₂₆₀-Einheiten 5S RNA von *E. coli* bzw. *B. stearothermophilus* aufgebracht.

Die Elektrophorese lief bei Raumtemperatur bei einer Stromstärke von 10-15 mA und wurde abgebrochen, sobald das Bromphenolblau den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Anschließend färbte man die Gele in einer Lösung aus 0,1% Toluidinblau in 1% Essigsäure und entfärbte sie in Wasser oder 10% Essigsäure, bis nur noch die RNA-haltigen Gelabschnitte eine Blaufärbung aufwiesen.

Zur Anfertigung einer Autoradiographie wurde das Gel auf

Whatman 3MM-Papier gelegt und auf einem Geltrockner getrocknet. Je nach Stärke der Radioaktivität wurden die RNA-Polyacrylamidgele bis zu 150 Tagen auf einen Röntgenfilm gelegt (vgl. S.38, Abschnitt 3.7.1.).

3.7. Methoden zur Identifizierung radioaktiv markierter Proteine

3.7.1. Autoradiographie

Allen nun folgenden Methoden zur Identifizierung markierter Proteine, seien sie elektrophoretischer oder immunologischer Art, schloß sich eine Autoradiographie an. Je nach Menge der Radioaktivität betrug die Belichtungszeit 50 bis 200 Tage. Lediglich die Autoradiogramme des direkt markierten Gesamtproteins konnten in der Regel nach 1 bis 5 Tagen entwickelt werden.

3.7.1.1. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann im Mikromaßstab

Die zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann (1970) wurde im Mikromaßstab in einer Kammer nach Lin et al. (1976) durchgeführt.

Erste Dimension:

Für die erste Dimension wurden bis zu 10 Glaskapillaren von 55mm Länge und einem Innendurchmesser von 1mm benötigt. Zuerst setzte man die Gellösung für das 5% Untergel an, indem man 1,25 ml Gellösung mit 10 μ l 7% Ammoniumperoxodisulfat mischte. Durch die Kapillarkräfte wurde die Lösung 3 cm in die Glasröhrchen gesaugt und anschließend 15 Minuten zum Polymerisieren stehengelassen. Bevor dann die zu untersuchende Probe aufgetragen werden konnte, mußte der flüssige Überstand mit einer ausgezogenen Kapillare entfernt werden.

Da man es bei der Affinitätsmarkierung mit relativ kleinen Mengen an Radioaktivität zu tun hatte, wurde pro Gel möglichst viel Protein aufgetragen, um allzu lange Belichtungszeiten bei der Autoradiographie zu vermeiden.

Folgende Mengen an ribosomalen Proteinen wurden je Gel

aufgegeben:	bei 50S Proteinen	90 bis 150 μ g
	bei 30S Proteinen	50 bis 90 μ g
	bei 70S Proteinen	150 bis 200 μ g

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann wurden die aufzutrennenden Proteine einpolymerisiert. Dazu versetzte man 1 ml Probengel mit 10 μ l einer Ammoniumperoxodisulfat/ Riboflavin-Lösung, löste jede Probe in 5 bis 6 μ l Probengel und trug sie mit einer ausgezogenen Kapillare auf das Untergel auf. Anschließend legte man die Gele zum Polymerisieren für 10 Minuten unter eine weiße Osramlampe. Bevor nun das 10% Obergel (1,25 ml Gellösung + 10 μ l 7% Ammoniumperoxodisulfat) aufgetragen werden konnte, mußte wiederum der wässrige Überstand abgetupft werden. Mit Hilfe einer Spritze wurde dann das Probengel blasenfrei mit dem Obergel überschichtet. Nachdem auch dieses vollständig durchpolymerisiert war, wurden die kleinen Kapillaren in eine Elektrophoresekammer für Rundgele eingebracht, und die beiden Elektrophoresekammern mit dem Puffer für die erste Dimension gefüllt. Die Elektrophorese lief nun für 60 Minuten bei 150 Volt und anschließend für 30 Minuten bei 160 Volt.

2. Dimension:

Während des Elektrophoreselaufs wurde die Kammer für die Gele der zweiten Dimension nach Lin et al. (1976) mit Glasscheiben bestückt und mit heißer 2% Agaroselösung gründlich abgedichtet.

100 ml Bodengel wurden mit 7 ml 7% Ammoniumperoxodisulfat vermischt und in einen flachen Plexiglasbehälter gegossen, in den anschließend die 2D-Kammer hineingestellt wurde.

Nach Beendigung der ersten Dimension stellte man das Trenngel her (50 ml Trenngel + 1,8 ml 7% Ammoniumperoxodisulfat). Jedes Gelröhrchen wurde einzeln zerschlagen, von den Glassplittern befreit und auf das frisch gegossene 2. Dimensionsgel gelegt. Dabei war unbedingt zu beachten, daß ab und zu einige Tropfen Trenngel auf die einzelnen Flachgele pipettiert

wurden, damit die Rundgele auch fest an die zweite Dimension anpolymerisieren konnten. Nachdem alle 10 Gele vollständig durchpolymerisiert waren, wurde die Wanne mit dem Bodengel entfernt, die Elektrophoresekammer in den Pufferbehälter gestellt und beide Kammern mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die zweite Dimension wurde nun vier Stunden bei 65 Volt elektrophoresiert.

Nach Beendigung des Laufs zog man die Gele aus der Apparatur heraus, färbte sie für 30 Minuten mit einer Coomassieblau-Lösung an und legte sie über Nacht ins Entfärbebad. Wie die eindimensionalen RNA-Polyacrylamidgele (Abschnitt 3.6.), wurden auch die zweidimensionalen Elektrophoresen getrocknet und zur Autoradiographie auf einen Röntgenfilm gelegt.

3.7.1.2. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese nach Geyl et al. im Mikromaßstab

Diese zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese, die von Geyl et al. (1981) beschrieben wird, ist eine Kombination zweier verschiedener Systeme. Die Bedingungen für die erste Dimension entstammen der von Mets und Bogorad (1974) entwickelten Methode, während die zweite Dimension dem Gelsystem von Kaltschmidt und Wittmann (1970) identisch ist. Geyl et al. haben für ihre Elektrophorese die ribosomalen Proteine von *E. coli* mit den Proteinflecken auf den Kaltschmidt-Wittmannschen Gelen verglichen und zugeordnet. Für die ribosomalen Proteine von *B. stearo.* existiert allerdings noch keine entsprechende Zuordnung, was bedauerlich ist, da die Proteine von *B. stearo.*, aufgetrennt nach dieser Methode, ein übersichtlicheres Proteinmuster geben als unter den Elektrophoresebedingungen von Kaltschmidt und Wittmann.

Die zweidimensionale Gelelektrophorese nach Geyl et al. wurde ebenfalls im Mikromaßstab in einer Kammer nach Lin et al. (1976) durchgeführt. Für 10 Gelröhrchen (60 mm x 1 mm)

wurden 1 ml eisgekühlte Gellösung, 3,5 μ l TEMED und 10 μ l 7% Ammoniumperoxodisulfat zusammengegeben und vermischt. Durch Kapillarkräfte wurde soviel Gellösung aufgezogen, daß der Flüssigkeitsspiegel ca. 5 mm unterhalb des Glasrandes lag. Um eine glatte Geloberfläche zu erhalten, wurde das Gel vorsichtig mit einer 4M Harnstofflösung überschichtet.

Pro Röhrchen wurden die gleichen Mengen Protein aufgegeben wie bei der Elektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann. Nach vollständiger Polymerisation und Entfernung der Harnstofflösung wurden die ribosomalen Proteine in ca. 5 μ l Proteinlösungspuffer aufgenommen und mit einer ausgezogenen Kapillare blasenfrei auf das Gel aufgebracht. Anschließend wurden die Gele in eine Elektrophoresekammer für Rundgele gesteckt, und beide Kammern mit ihrem entsprechenden Elektrodenpuffer aufgefüllt. Die Elektrophorese lief in der Kälte bei 65 bis 80 Volt solange, bis der Farbmarker, der dem Proteinlösungspuffer beigemischt war, das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Die zweite Dimension wurde genauso durchgeführt, wie es in Abschnitt 3.7.1.1. beschrieben ist, mit der Ausnahme, daß die Elektrophorese in der Kälte für 15 Stunden bei einer Spannung von 50 V lief.

3.7.1.3. Eindimensionale Celluloseacetatgelelektrophorese

Außer den beiden zweidimensionalen Elektrophoresetechniken wurde eine eindimensionale Celluloseacetatgelelektrophorese mit anschließender Autoradiographie zur Identifizierung der markierten ribosomalen Proteine durchgeführt (Stöffler, 1967; Zubke et al., 1977). Der Celluloseacetatstreifen wurde vor seiner Benutzung zweimal mit dem Elektrophoresepuffer D äquilibriert, kurz abgetupft und in die Elektrophoresekammer eingespannt, die mit demselben Puffer D gefüllt war. Die aufzutragenden Proteine löste man in einer Konzen-

tration von 50mg/ml in Puffer E. Je Elektrophoreselauf konnten mit einem Probenaufgeber bis zu acht Proben auf der Anodenseite aufgetragen werden. Pro Spur wurden 25 bis 75 µg Protein verwendet. Bei einer Spannung von 350 V betrug die Laufzeit 90 Minuten. Anschließend wurden die Proteine zweimal mit 12,5% Trichloressigsäure fixiert und über Nacht in einer Coomassieblaulösung in 7% Essigsäure angefärbt. Entfärbt wurden die Gele in einer Lösung bestehend aus 50% Methanol, 7,5% Essigsäure und destilliertem Wasser. Danach legte man sie zum Entwässern für ein bis zwei Minuten in Methanol. Bevor man die Gele in einem Trockenschrank bei ca. 100°C trocknen konnte, mußte man die Zelluloseacetatgele noch für eine Minute zum Transparentmachen in eine Lösung aus 14% Essigsäure, 1% Phthalsäuredimethylester und Methanol legen.

3.7.1.4. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony

Die Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony (1958) wurde auf Glasplatten (12 cm x 9 cm) in medizinischen Instrumentenschalen (30 cm x 20 cm) durchgeführt. In diesen Schalen konnten bis zu vier Glasplatten untergebracht werden.

Nachdem die Platten gründlich mit Chromschwefelsäure gereinigt worden waren, mußten sie mit einem Grundagar beschichtet werden, damit das Hauptgel fest an das Glas haften konnte. Dazu wurden auf jeder Platte 1 ml 2% Agarose in bidestilliertem Wasser mit einem Pinsel gleichmäßig verteilt und anschließend für ca. fünf Minuten in den Trockenschrank gestellt, bis die Schicht fest war. Diese so präparierten Glasplatten wurden in die Instrumentenschalen gelegt, die zur Nivellierung des Wannenbodens mit 300 ml einer 2% Agaroselösung ausgegossen waren.

Für das Hauptgel wurden 4,5 g Agarose in 200 ml bidestilliertem Wasser gelöst und zu 100 ml Stammpuffer, der 9,6 g

Lithiumchlorid und etwas Cialit^R enthielt, gegeben. Nach kräftigem Mischen goß man das Gel auf die Glasplatten in den Instrumentenschalen. Diese Agarplatten konnten frühestens nach vier Stunden benutzt werden, in der Regel jedoch ließ man sie über Nacht in der Kälte stehen.

Zur Benutzung wurden die mit dem Gel beschichteten Glasplatten herausgeschnitten und in jedes Gel bis zu vier Rosetten gestanzt, die aus einem zentralen und sechs peripheren Löchern bestanden.

In das zentrale Loch wurde zwischen 50 und 100 μ g in 8M Harnstoff gelöstes Protein aus 70S Ribosomen gegeben (bzw. bei 30S Protein 25 bis 35 μ g, und bei 50S Protein 35 bis 50 μ g). Die Antiseren gegen die einzelnen ribosomalen Proteine füllte man in die peripheren Löcher ein, mit Ausnahme von Anti-L31, das bisher immunologisch nicht untersucht ist. Alle Löcher wurden bis zum oberen Rand mit PBS-Puffer aufgefüllt. Die Diffusionszeit betrug in der Kälte 48 bis 72 Stunden.

Um freie Proteine und lösliche Immunkomplexe herauszuwaschen, wurden die Gele für drei bis vier Tage in Waschpuffer gelegt (Puffer täglich zweimal gewechselt), einen Tag in destilliertem Wasser gewässert (dreimal gewechselt) und bei Beleuchtung über einem Dunkelfeld photographiert.

Für die Autoradiographie wurden die Gele getrocknet, indem man sie mit der Glasplatte auf ein trockenes Stück Filterpapier legte und mit einem großen feuchten Filterbogen den Agar bedeckte und so lange an der Luft stehen ließ, bis sich das obere Papier vollständig gelöst hatte.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1. Synthese von N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycin

Die Synthese von N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycin wurde in Anlehnung an die Methode von Pongs et al. (1973) durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.3.). Die Ausbeute variierte von Präparation zu Präparation sehr stark; sie lag zwischen 6 und 35%. Zur Kontrolle wurde von jedem Syntheseprodukt ein UV-Spektrum angefertigt. Das N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycin hatte hier ein Minimum bei 242,5 nm und ein Maximum bei einer Wellenlänge von 275 nm. Die Reinheit des Produkts wurde außerdem durch eine Dünnschichtchromatographie auf Aluminiumoxydplatten getestet. Der R_F-Wert des N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycins lag bei 0,4 unter Verwendung von CH₂Cl₂/CH₃OH (95 : 5) als Fließmittel (vgl. Abschnitt 3.3.). In einigen Fällen konnte im UV-Licht eine kleinere Verunreinigung gesehen werden, die aber in jedem Fall unter 5% lag, so daß dieses synthetisierte N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycin bedenkenlos für die Umsetzung mit den Ribosomen und seinen Untereinheiten sowie den isolierten ribosomalen Proteinen eingesetzt werden konnte.

4.2. Umsetzung von 50S- und 30S Untereinheiten, 70S Ribosomen und isolierten ribosomalen Proteinen von E. coli

4.2.1. Umsetzung von 50S- und 30S Untereinheiten, 70S Ribosomen und isolierten ribosomalen Proteinen von E. coli mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin

Die 50S Untereinheiten von E. coli wurden in vier Experimenten nach der in Abschnitt 3.4.1. beschriebenen Methode mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin umgesetzt (vgl. Tabelle 2). Der Einbau von radioaktivem Affinitätsmarkierungsreagens lag zwischen 0,3 und 0,6 Mol pro Mol Untereinheit.

30S Untereinheiten, 70S Ribosomen und ribosomale Proteine wurden in je einem Versuch mit dem Puromycinanalogon umgesetzt. Bei den 30S Untereinheiten lag der Einbau bei 1,7 Mol pro Mol Untereinheit, etwas höher lag er bei den 70S Ribosomen (1,9), während die isolierten Proteine mit einem Wert von 13,5 Mol pro Mol Protein (1nm $\approx$ 1,85 mg) einen sehr starken Markierungsgrad erreicht hatten.

	Anzahl der Umsetzungen	Einbau je Mol	Radioaktivitätsverteilung in %	
			Protein	RNA
50S	4	0,3 - 0,6	80 - 85	15 - 20
30S	1	1,7	89	11
70S	1	1,9	91	9
TP50	1	13,5	-	-

Tabelle 2: Affinitätsmarkierung von 50S und 30S Untereinheiten, 70S Ribosomen sowie Umsetzung von isoliertem Protein mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin.

Alle mit N-Brom- (^{14}C) -acetylpuromycin umgesetzten 30S- bzw. 50S Untereinheiten und 70S Ribosomen wurden aus Essigsäure extrahiert. Zur Kontrolle, ob alle Proteine quantitativ gewonnen werden konnten, wurde von jedem Produkt eine Celluloseacetat-gelelektrophorese sowie eine Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony angefertigt. Beide Methoden zeigten im Vergleich mit einer unmarkierten Proteinprobe gleich starke Banden bzw. Präzipitationslinien, was bedeutet, daß durch die Umsetzung keine Proteine verloren gegangen sind.

Die bei der Essigsäureextraktion ausgefallene RNA wurde durch Erhöhung des pH-Wertes wieder in Lösung gebracht. Durch Messung der Radioaktivität von RNA und Protein im Szintillationszähler konnte die Verteilung zwischen beiden ribosomalen Komponenten bestimmt werden. Wie in Tabelle 2 gezeigt, lagen in den 50S Untereinheiten zwischen 15 und 20% des N-Brom- (^{14}C) -acetylpuromycins an die RNA gebunden vor. Bei den 30S Untereinheiten sowie den 70S Ribosomen lag die Verteilung der Radioaktivität zwischen Protein und RNA bei ungefähr 90 zu 10.

4.2.2. Umsetzung von 50S Untereinheiten und TP50 mit (^{14}C) -Jodacetamid

In je einem Experiment wurden 50S Untereinheiten und ribosomale Proteine mit (^{14}C) -Jodacetamid umgesetzt. Vom Alkylierungsreagens wurden nur 0,1 Mol pro Mol 50S eingebaut (Tabelle 3). Aber auch bei den isolierten Proteinen lag der Einbau um fast das zweieinhalbfache niedriger als bei der entsprechenden Umsetzung mit N-Brom- (^{14}C) -acetylpuromycin.

Die aus Essigsäure extrahierten Proteine der 50S Untereinheit wurden zur Kontrolle ebenfalls einer Celluloseacetat-gelelektrophorese und einer Immundoppeldiffusion unterzogen. Mit beiden Methoden konnte auch in diesem Fall gezeigt werden, daß durch die Umsetzung keine Proteine verlorengegangen sind.

Die Radioaktivitätsverteilung zwischen Protein

und RNA betrug 9 : 1 und lag damit etwas mehr auf der Seite der Proteine als bei der Umsetzung der 50S Untereinheiten mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin.

	Anzahl der Umsetzungen	Einbau je Mol	Radioaktivitätsverteilung in %	
			Protein	RNA
50S	1	0,1	90	10
TP50	1	5,6	-	-

Tabelle 3: Umsetzung von 50S Untereinheiten und deren isolierten Proteinen mit (^{14}C)-Jodacetamid.

4.3. Bindung von N-Brom-(^{14}C)-acetylpurromycin und (^{14}C)-Jodacetamid an die ribosomale RNA der 50S Untereinheit

Zur Untersuchung, ob sowohl die 23S- als auch die 5S RNA vom Affinitätsmarkierungsreagens umgesetzt worden sind, wurde die RNA auf einem 5% Polyacrylamidgel aufgetrennt und von dem getrockneten Gel ein Autoradiogramm angefertigt. Dieses zeigte, daß neben der 23S RNA, die zum Teil degradiert war, auch die 5S RNA mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpurromycin reagiert hatte.

Die RNA der mit (^{14}C)-Jodacetamid umgesetzten 50S Untereinheiten wurde ebenfalls auf einem 5% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Da sie insgesamt zu gering markiert war, konnte die Autoradiographie keine Aufschlüsse darüber geben, ob neben der 23S RNA auch die 5S RNA modifiziert worden war.

4.4. Identifizierung der mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin markierten ribosomalen Proteine von *E. coli*

Ungenaue Methoden zur Identifizierung radioaktiv markierter Proteine können zu einem großen Teil Schuld an Fehlinterpretationen sein. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedenartige Methoden getestet, ob sie allein eine sichere Identifizierung affinitätsmarkierter Proteine ermöglichen. Nach kurzer Zeit wurde aber deutlich, daß keine der Methoden für sich allein hinreichend geeignet war, um eine klare Aussage zu treffen. Deshalb war es erforderlich, mehrere Methoden anzuwenden, und die Ergebnisse, die man durch sie erhielt, miteinander zu vergleichen. So wurden die Proteine auf unterschiedliche Art und Weise aufgetrennt, in jedem Fall aber autoradiographisch identifiziert. Zur Auftrennung benutzte man die zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophoresen nach Kaltschmidt und Wittmann (1970a) sowie Geyl et al. (1981) im Mikromaßstab, die Immundoppeldiffusion in Agarosegelen nach Duchterlony (1958) und eine eindimensionale Cellulose-acetatgelelektrophorese (Stöffler, 1967; Zubke et al., 1977).

4.4.1. Identifizierung der N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin markierten Proteine der SOS Untereinheit von *E. coli*

4.4.1.1. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann im Mikromaßstab

Die mit Essigsäure extrahierten Proteine der mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin umgesetzten SOS Untereinheit wurden einer zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann unterzogen. Diese wurde im Mikromaßstab durchgeführt (Lin et al., 1976). Da die Gele klein und vor allem sehr dünn sind, kam man mit wenig Material aus, obwohl nur geringe Mengen N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin je Mol SOS Untereinheit eingebaut worden sind.

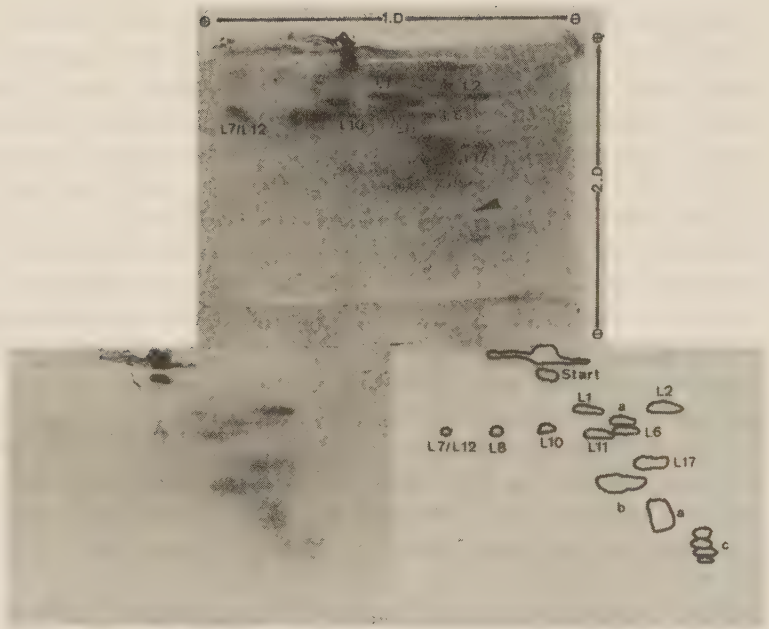


Abbildung 6: Zweidimensionales Polyacrylamidgelelektropherogramm nach der Methode von Kaltschmidt und Wittmann im Mikromaßstab (oben) mit dem dazugehörigen Autoradiogramm (unten links) sowie einer schematischen Darstellung der radioaktiven Schwärzungen (unten rechts). Aufgetrennt wurden die Proteine der mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin umgesetzten 50S Untereinheit.

Die zweidimensionalen Gele zeigten alle angefärbten Proteine an den typischen Positionen (Kaltschmidt und Wittmann, 1970b) und in der üblichen Intensität (Abbildung 6). Allerdings kam es hier, im Gegensatz zu den mit (^{14}C)-Jodamphenicol umgesetzten Proteinen (vgl. Abbildung 18, Seite 98), generell zu leichten Verschmierungen der Proteinflecken.

Betrachtet man das Autoradiogramm, so sieht man große Mengen an Radioaktivität (etwa 70-80%) am Start und für eine spezifische Affinitätsmarkierung sehr viele radioaktive Flecken. Im oberen Bereich des Autoradiogramms finden sich klar abgegrenzte Schwärzungspunkte, während in der mittleren und unteren Region die Auflösung der Flecken schlechter wird, was bedeutet, daß damit eine Zuordnung der Radioaktivität zu den einzelnen Proteinen schwerer möglich ist. Eine weitere Schwierigkeit bei der Beurteilung der Autoradiogramme von zweidimensionalen Gelen liegt darin, daß die Proteine durch ihre Markierung eine Ladungsänderung erfahren können und dadurch ein unterschiedliches Laufverhalten zu den nicht markierten bekommen können, so daß sich Schwärzung und gefärbter Proteinfleck nicht immer zur Deckung bringen lassen. Gerade in einem Bereich, in dem sehr viele Proteine zusammenliegen, ist deshalb eine Interpretation mit äußerster Vorsicht vorzunehmen.

Bringt man jetzt die geschwärzten Flecken des Autoradiogramms mit den gefärbten des zweidimensionalen Gelelektropherogramms zur Deckung, dann findet man Radioaktivität in den Flecken L1, L2, L6, L7/L12, L10, L11, L17 und im Bereich des früher als Protein L8 bezeichneten Fleckens, der bei späteren Untersuchungen als pentamerer Proteinkomplex $(\text{L7/L12})_4\text{L10}$ identifiziert wurde. Diese Schwärzungen lassen sich eindeutig den angefärbten Proteinen zuordnen. Hiervon sind L2, gefolgt von L17, die am stärksten markierten Proteine. Auf einem der untersuchten Autoradiogramme konnte für L1 eine ähnlich starke Schwärzung gefunden werden wie für L2.

Zwei diffuse, schlecht abgegrenzte Schwärzungsbereiche, die mit b und c bezeichnet sind, liegen im mittleren und unteren

Teil des Gels. In der Region um b wandern die Proteine L22 und L23. Ob die Schwärzung von einem Protein kommt oder aber von beiden, kann nicht gesagt werden. Das gleiche gilt für den Bereich c, in dem L26, L27 und L28 zu finden sind. Zwei Flecken, die mit a bezeichnet werden, treten in Regionen auf, in denen kein gefärbtes 50S Protein liegt (vgl. Pfeile auf dem Gel mit den Flecken auf dem Autoradiogramm). Untersuchungen an 30S Untereinheiten, sowie 70S Ribosomen (vgl. Abschnitt 4.4.5. und 4.4.6., Seite 76-85) zeigten, daß Protein S18 besonders stark markiert wird. Dieses Protein liegt in dem unteren Bereich des Gels, in dem auch die starke Radioaktivität a liegt. Es ist also durchaus denkbar, daß eine geringe Verunreinigung der 50S Untereinheit mit Proteinen der 30S Untereinheit zu dieser Schwärzung auf dem Autoradiogramm führt.

Diese Ergebnisse waren in jedem Fall reproduzierbar mit der einen Ausnahme, daß für L1 einmal eine ähnlich starke Schwärzung gefunden wurde wie für L2. Außerdem zeigte sich, daß trotz gleicher Bedingungen (gleiche Mengen Protein und gleiche Entwicklungszeit) die Radioaktivität der Proteine insgesamt auf den Autoradiogrammen variierte. Das bedeutet, daß von Gel zu Gel die radioaktiv markierten Proteine unterschiedlich stark am Start zurückgehalten werden. Ob dies nun für alle Proteine gleichermaßen gilt, oder ob einige besonders stark zurückgehalten werden, kann nicht gesagt werden. Vergleicht man aber die Startregion auf dem gefärbten Gel mit der dazugehörigen Schwärzung, so scheinen die markierten Proteine in einem stärkeren Maße zurückgehalten zu werden als die unmarkierten.

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann wird das Protein in das erste Dimensionsgel einpolymerisiert, und es bestand daher die Vermutung, daß zumindest ein Teil der Proteine mit dem Acrylamid während der Polymerisation reagiert und somit nicht mehr die Möglichkeit hat, im elektrischen Feld zu wandern.

Als erstes wurde untersucht, ob durch Änderung der Polymerisationsbedingungen, d.h. Verwendung verschiedener Katalysatoren

zur Polymerisation, dieses Problem gelöst werden könnte. Diese Experimente führten allerdings zu keinem positiven Ergebnis. Deshalb wurden andere zweidimensionale Gelsysteme untersucht, bei denen man die zu trennende Probe flüssig auf das Gel für die erste Dimension auftrug. Eine dieser Methoden wurde von Geyl und Mitarbeitern (1981) entwickelt, auf deren Ergebnisse im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

4.4.1.2. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese nach Geyl et al. im Mikromaßstab

Mit der Methode nach Geyl et al. erreicht man eine Auftrennung, die in ihrer Qualität im Vergleich zu unmarkiertem TP50 relativ gut ist. Im Gegensatz zur eben beschriebenen zweidimensionalen Gelelektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann bleibt weniger anfärbbares Material am Start zurück.

Betrachtet man das Autoradiogramm, so sieht man auch hier viele radioaktive Flecken unterschiedlicher Schwärzung, die im oberen Bereich klar abgegrenzt erscheinen, allerdings in der mittleren und unteren Region diffus in Erscheinung treten (Abbildung 7).

Bringt man nun Autoradiogramm und Gel zur Deckung, findet man mit Ausnahme von L7/L12 den gleichen Satz an Proteinen markiert. Zusätzlich erscheint eine schwache Radioaktivität im Bereich von L22. Der mit b bezeichnete Fleck könnte L21 oder L23 sein. Aufgrund der unterschiedlichen Nachbarn in beiden zweidimensionalen Systemen, deutet sich an, daß es sich hierbei um das Protein L23 handelt. Demgegenüber gibt es in der Region c keine Möglichkeit, zwischen L27 und L28 zu unterscheiden. Im unteren Bereich des Gels findet man wiederum Radioaktivität (a), in deren Nähe keine Proteine zu finden sind. Diese Region trennt sich hier aber in zwei unterschiedlich laufende Schwärzungsbereiche auf. Der Fleck d im oberen Drittel des Elektropherogramms trifft mit einer Färbung zusammen, die wahrscheinlich zu einem aggregierten ribosomalen Protein gehört. In einigen Gelen, wie auch im abgebildeten Beispiel,

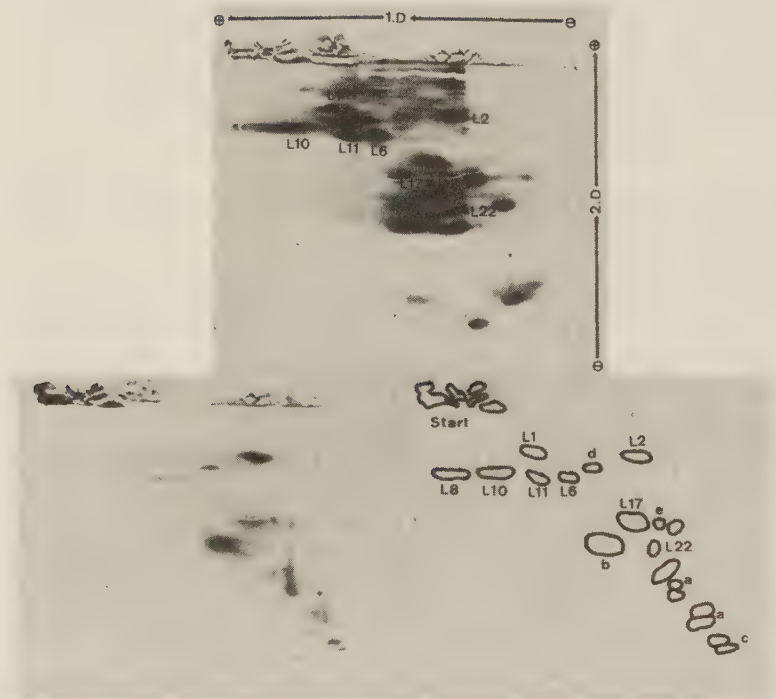


Abbildung 7: Zweidimensionales Polyacrylamidgelelektropherogramm nach der Methode von Geyl et al. im Mikromaßstab (oben) mit dem dazugehörigen Autoradiogramm (unten links) sowie einer schematischen Darstellung der radioaktiven Schwärzungen (unten rechts). Aufgetrennt wurden die Proteine der mit N-Brom- (^{14}C) -acetylpuromycin umgesetzten 50S Untereinheit.

konnte in der Nähe des Proteins L16 (e) eine Schwärzung beobachtet werden, während manchmal auch Radioaktivität in der Nähe des Proteins L24 gefunden wurde. L1, das auf dem hier abgebildeten Gel nur sehr schwach modifiziert ist, konnte in zwei Fällen auch mit dieser Methode wesentlich stärker markiert gefunden werden. Da die in diesen Gelen untersuchten Proben aus demselben Affinitätsmarkierungsansatz stammten, wie die eine, die auch in der zweidimensionalen Gelelektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann für L1 eine starke Radioaktivität aufwies, liegt die Vermutung nahe, daß der Markierungsgrad von L1 bei den vier Umsetzungen variiert.

Zusammenfassend kann man sagen, daß L2 und L23 gefolgt von L17 die am stärksten markierten Proteine sind. Eine geringe Radioaktivität tragen dagegen L6, L7/L12, L10, L11 und L22. Ob Protein L1 zu den Hauptmarkierungsproteinen zählt oder zu den schwach markierten, kann nicht gesagt werden.

Beide zweidimensionalen Gelelektrophoresen liefern im großen und ganzen ähnliche Ergebnisse, das bedeutet: diese zweite Methode bringt gegenüber der ersten keine wesentlichen Verbesserung für die Identifizierung der Proteine. Allerdings konnte wegen der Verwendung beider Systeme eine Markierung des Proteins L23 sehr wahrscheinlich gemacht werden. Das Problem, zwischen L27 und L28 zu differenzieren, bleibt jedoch weiterhin bestehen. Auch ist es nicht gelungen, die Radioaktivität in der Startregion aufzutrennen. Zwar bleibt bei der Elektrophorese nach Geyl et al. weniger anfärbbares Material am Start zurück als bei der ersten, aber immer noch soviel, daß eine quantitative Aussage nur mit größter Vorsicht vorgenommen werden kann und auf jeden Fall mit anderen Methoden überprüft werden muß. Es kann nämlich nicht ausgeschlossen werden, daß einige Proteine präferentiell zurückgehalten werden.

Die Methode nach Geyl et al. zeigt aber, daß die Proteine nicht unbedingt während der Polymerisation mit dem Acrylamid reagieren, da hier ja die Probe flüssig auf das Gel aufgetragen wird. Es ist also möglich, daß die Proteine auch noch nach

der Polymerisation mit dem Acrylamid reagieren können. Außerdem erkennt man aus dem Gel in Abbildung 8, daß zusätzlich die Polymerisationslinie zwischen erster und zweiter Dimension eine Barriere für die Proteine darstellt.

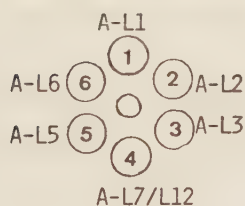
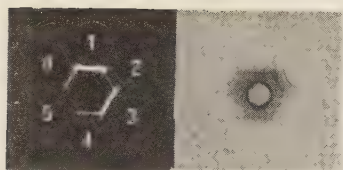
Die zweidimensionale Gelelektrophorese ist zwar eine optimale Proteintrennungsmethode, sie ist aber zur Trennung affinitätsmarkierter Proteine weniger gut geeignet. Deshalb war es unbedingt erforderlich, die Markierung der Proteine mit einer weiteren Methode zu untersuchen.

4.4.1.3. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony

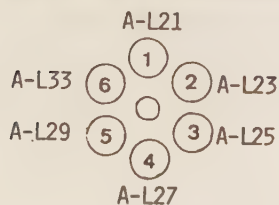
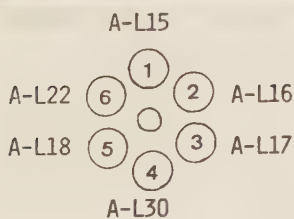
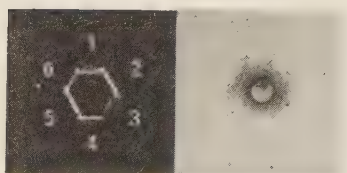
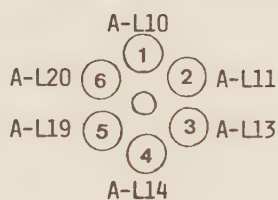
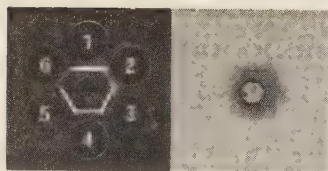
Bei der Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony (1958) wurden die isolierten ribosomalen Proteine in Agarosegelen mit spezifischen Antikörpern gegen 28 Proteine der großen Untereinheit untersucht. Ein Antiserum gegen L31 stand nicht zur Verfügung. Auch L26, L28 und L32 konnten immunologisch nicht untersucht werden, da diese Antiseren Verunreinigungen enthielten, die zum Teil nicht bekannt waren. Mit Ausnahme von L20 ergaben alle Proteine mit ihren Antiseren deutlich sichtbare Präzipitationsbanden. Abbildung 8 zeigt die Immundiffusionsogramme mit ihren dazugehörigen Autoradiogrammen.

Alle Proteine, die in der zweidimensionalen Gelelektrophorese identifiziert worden sind, konnten mit der Immundoppeldiffusion bestätigt werden. Besonders stark fallen die Schwärzungen der Präzipitationslinien von L2, L23 und L27 aus. Im Falle von L1 bestätigt sich, was aufgrund der zweidimensionalen Gelelektrophoresen vermutet wurde. Man findet dieses Protein in jedem Fall markiert, doch variiert die Stärke der Radioaktivität je nach Umsetzung. In der hier gezeigten Abbildung weist L1 eine mittelstarke Radioaktivität auf. In Rosette 1, Position 1 erscheint dieses Protein nur mit einer relativ schwachen Markierung, aber die Präzipitationslinie in Rosette 6, Position 4, die nur schwach ausgebildet ist, gibt eine wesentlich stärkere Schwärzung auf dem Autoradiogramm. Auch L17 (Rosette 3, Posi-

Rosette 1

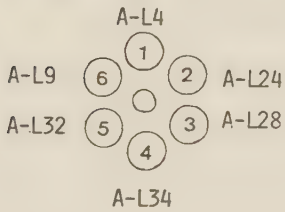


Rosette 2

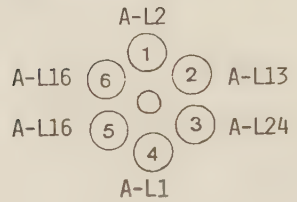
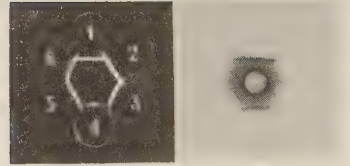


Rosette 3

Rosette 4



Rosette 5



Rosette 6

Abbildung 8: Immunodiffusogramme von Proteinen der mit N-Brom- (^{14}C) -acetylpuromycin affinitätsmarkierten SOS Untereinheit mit den dazugehörigen Autoradiogrammen.

tion 3) muß zu den stärker markierten Proteinen gezählt werden, da die Radioaktivität trotz schwacher Bande relativ stark ist. Eine deutlich geringere Schwärzung geben die Linien der Proteine L6, L7/L12, L10, L11 und L22. Zusätzlich findet man Radioaktivität in Protein L14 (Rosette 2, Position 4), die in der zweidimensionalen Gelelektrophorese in keinem Fall gesehen wurde.

Obwohl die Präzipitationslinien von L4, L9 und L16 in Rosette 3, Position 2 auf dem Autoradiogramm deutlich sichtbare Schwärzungen geben, sind diese Proteine als nicht markiert anzusehen, denn ihre Radioaktivität beruht auf bekannten Verunreinigungen dieser Antiseren. Um Fehler zu vermeiden, wurden in diesen Fällen die Markierung der Proteine mit anderen Seren überprüft. Als Beispiel soll hier L16 dienen. In Rosette 3, Position 2 gibt die Präzipitationslinie mit dem Antiserum, das geringe Mengen Anti-L2 enthält, im Autoradiogramm eine leichte Schwärzung. In Rosette 6, Position 5 und 6 wurden in die peripheren Löcher zwei andere, reine Anti-L16 Seren eingefüllt. Hier kann keine Radioaktivität auf dem Autoradiogramm gefunden werden. Das bedeutet, daß die Schwärzung, die in einigen Fällen bei der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese nach Geyl et al. in der Nähe von L16 auftrat, nicht von diesem Protein stammt. (vgl. Abschnitt 4.4.1.2., Seite 53) Auch L24, das dort manchmal zu finden war, bleibt bei der Immundoppeldiffusion unmarkiert.

Der in den zweidimensionalen Gelelektropherogrammen mit b bezeichnete Fleck wurde aufgrund der Kombination der Ergebnisse beider Elektrophoresesysteme bereits mit großer Wahrscheinlichkeit als L23 identifiziert. Mit der immunologischen Methode kann dieses Ergebnis jetzt zweifelsfrei bestätigt werden, da die Präzipitationslinie von L23 auf dem Autoradiogramm eine starke Schwärzung aufweist, während L22 nur schwach und L21 überhaupt nicht markiert sind. Über die mit c bezeichneten Flecken läßt sich sagen, daß die Radioaktivität vom Protein L 27 stammt. Die mit a bezeichneten Flecken können keinem Protein der 50S Untereinheit zugeordnet werden. Mit

Antiseren gegen S 18 wurde gezeigt, daß es sich hierbei um eine geringfügige Verunreinigung der 50S Proteine mit Protein S18 handelt. Deutlich wird dies auch in Rosette 5, Position 5. In das periphere Loch wurde ein Antiserum gegen L32 eingefüllt, das eine Anti-S18-Verunreinigung hat. Auf dem Autoradiogramm findet man in der Mitte zwischen peripherem und zentralem Loch eine kräftige Schwärzung, obwohl dort auf dem Agarosegel keine Präzipitationslinie zu finden ist. Dies macht deutlich, daß ganz geringe Mengen dieses Proteins schon eine außerordentlich starke Schwärzung verursachen.

Eine Identifizierung markierter Proteine mit dieser immunologischen Methode allein ist sicherlich möglich, vorausgesetzt, daß man eventuelle Verunreinigungen der Antiseren kennt. Allerdings ist eine Kombination mit der Autoradiographie zweidimensionaler Gele besser, da man durch den Vergleich der Ergebnisse Fehlinterpretationen ausschließen kann und somit eine Kontrollmöglichkeit besitzt. Die hier angewandte Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony ist eine semiquantitative Methode. Das bedeutet, daß man mit ihr, wie es hier versucht wurde, den Markierungsgrad einzelner Proteine nur abschätzen kann. Mit Ausnahme von L27 stimmen diese Abschätzungen mit denen der zweidimensionalen Gelelektrophoresen gut überein. Da allerdings sehr viele Proteine markiert worden sind, ist eine quantitative Methode noch unbedingt erforderlich. Dazu eignen sich eindimensionale Elektrophoresemethoden, die entweder nach Größe oder nach Ladung trennen, und, das ist Voraussetzung, bei denen nichts oder nur ganz wenig Material am Auftragspunkt zurückbleibt.

4.4.1.4. Eindimensionale Celluloseacetatgelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde als eindimensionale Elektrophorese die Celluloseacetatgelelektrophorese gewählt, mit der die 21 Proteine der 30S Untereinheit in ca. 14 Banden und die 32 Proteine der

50S Untereinheit in ca. 19 Banden aufgetrennt werden. Abbildung 9 zeigt so ein Celluloseacetatgelelektropherogramm. In Spur 1 und 2 sind nicht markierte 30S- bzw. 50S Proteine gelaufen, in Spur 3 Proteine von N-Brom- (^{14}C) -acetylpuromycin umgesetzten 50S Untereinheiten und in der vierten Spur befindet sich das dazugehörige Autoradiogramm. Ein Vergleich der Spuren 2 und 3 zeigt, daß die Umsetzung mit dem Affinitätsmarkierungsreagens keine Änderung der Proteinzusammensetzung zur Folge hatte (vgl. Abschnitt 4.2.1.). Wie man aus dieser Abbildung sieht, bleibt in den meisten Fällen

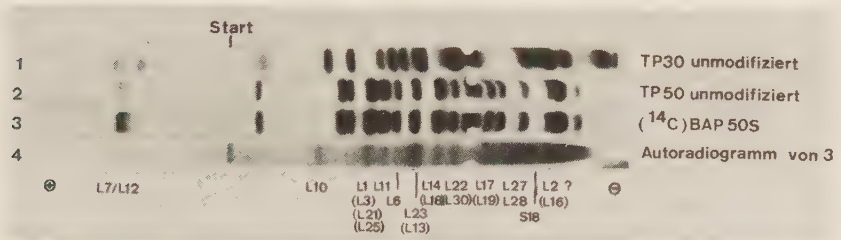


Abbildung 9: Celluloseacetatgelelektropherogramm. Spur 1: Proteine der 30S Untereinheit; Spur 2: Proteine der 50S Untereinheit; Spur 3: Proteine von N-Brom- (^{14}C) -acetylpuromycin umgesetzten 50S Untereinheit; Spur 4: Autoradiogramm der Spur 3.

kein Protein am Auftragspunkt zurück. Lediglich in der Spur 3 sieht man geringe Mengen an anfärbbarem Material, das aber nur eine geringe radioaktive Schwärzung auf dem Autoradiogramm gibt.

In der Spur 4 erkennt man eine Reihe von radioaktiven Banden

unterschiedlicher Stärke, die den einzelnen ribosomalen Proteinen zugeordnet sind. Dabei wurden diejenigen Proteine, die nach den bisherigen Untersuchungen eindeutig nicht markiert sind, in Klammern gesetzt. Die stärkste Radioaktivität zeigen L23, L27, das mit L28 in einer Bande läuft, L2 und zwei weitere Banden, die aber keinen 50S Proteinen zugeordnet werden können. Etwas schwächer erscheinen die Banden von L1 und L17, während die Proteine L7/L12, L10, L11, L6, L14 und L22 eine noch geringere Schwärzung geben. Mit der Celluloseacetatgelelektrophorese kann jetzt auch zweifelsfrei bestätigt werden, daß Protein L1 bei den vier verschiedenen Umsetzungen unterschiedlich stark markiert ist. So zeigt dieses Protein bei einer Umsetzung eine starke Radioaktivität, zweimal eine mittlere und einmal eine geringe. Obwohl dieses Protein eine Variabilität aufweist, muß es zu den stärker markierten gezählt werden. Außerdem wird durch die Celluloseacetatgelelektrophorese bestätigt, daß L14 markiert ist, was durch die Immundoppeldiffusion, nicht aber durch die zweidimensionalen Gelelektrophoresen gezeigt wurde. Bei den beiden stark radioaktiven Banden im kathodischen Bereich, die keinen 50S Proteinen zugeordnet werden können, kann es sich um die gleiche Radioaktivität handeln, die in der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit a bezeichnet wurde. Dabei zeigt sich wieder, daß die eine Schwärzung, die zwischen den Banden L27/L28 und L2/L16 auftaucht, tatsächlich dem Protein S18 zuzuordnen ist.

Nachdem nun gezeigt worden ist, daß L2, L23, L27, sowie etwas schwächer L1 (variabel) und L17 hauptsächlich markiert sind, konnten nun die radioaktiven Schwärzungen quantitativ bestimmt werden. Dieses wurde durch densitometrische Auswertung der Autoradiogramme gemacht. Das am stärksten markierte Protein ist L27 mit 18% der Radioaktivität, gefolgt von L2 (15%), L23 (13%), L1 (im Mittel 10%) und L17 (9%).

4.4.1.5. Zusammenfassung und Diskussion

Im Laufe der Untersuchungen zur Affinitätsmarkierung der SOS Untereinheiten hat sich gezeigt, daß die zweidimensionale Gelelektrophorese allein nur eine ungenaue Auskunft über die markierten Proteine gibt. Zuviel anfärbbares Material bleibt am Auftragspunkt zurück, so daß diese Methode quantitativ nicht auswertbar ist. Das Autoradiogramm zeigt zum Teil diffuse radioaktive Flecken, die gerade in Bereichen, in denen viele Proteine auf engem Raum zusammenliegen, keine genaue Interpretation zulassen (L23). Einzelne Proteine sind auf dem Autoradiogramm unterrepräsentiert (L27) oder können gar nicht gefunden werden (L14). All diese Mängel machen diese Methode für sich allein unbrauchbar zur genauen Identifizierung von Proteinen in der Affinitätsmarkierung. Dennoch findet man in der älteren wie in der neueren Literatur Untersuchungen, die sich allein dieser Methode bedienen (Pongs et al., 1973; Sonenberg et al., 1973; Högenauer et al., 1981). Eine Möglichkeit, die markierten Proteine genauer zu identifizieren, stellt die Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony dar, vorausgesetzt, daß die benutzten Antiseren gut charakterisiert sind. Um aber eine quantitative Aussage machen zu können, benötigt man noch eine weitere Technik, wie z.B. die eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese oder die hier angewandte Celluloseacetatgelelektrophorese. Zur Identifizierung von affinitätsmarkierten Proteinen reichen also grundsätzlich immunologische Methoden und eindimensionale Elektrophoresen aus. Dennoch hat die zweidimensionale Gelelektrophorese in Kombination mit den anderen hier angewandten Methoden durchaus ihren Wert, denn sie liefert eine gute Kontrolle für die Richtigkeit der erhaltenen Ergebnisse.

In der Tabelle 4 sind alle Daten für die Affinitätsmarkierung von E. coli SOS Untereinheiten mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin zusammengefaßt. Die Einzelergebnisse zeigen, daß L1, L2, L17, L23 und L27 die Hauptmarkierungsproteine sind. Daneben wurden

Protein	2D K-W	2D Geyl	Duchterlony	CAG	Ergebnis
L1	+(zT +++)	+(zT +++)	+ - +++	+ - +++	++
L2	+++	+++	+++	+++	+++
L3					
L4					
L5					
L6	+	+	+	+	+
L7/L12	+		+	+	+
L9					
L10	+	+	+	+	+
L11	+	+	+	+	+
L13					
L14			+	+	+
L15					
L16		zT +			
L17	++	++	++	++	++
L18					
L19					
L20					
L21		+++ (L23)			
L22	+++ (L23)	+	+	+	+
L23	+++ (L22)	+++ (L21)	+++	+++	+++
L24		zT +			
L25					
L26/S20	} +	} +			
L27			+++	+++ (L28)	+++
L28			?	?	?
L29-L34					

? Protein ist nicht genau identifizierbar

(LX) Das in Klammern stehende Protein könnte für die Radioaktivität verantwortlich sein.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse: Affinitätsmarkierung der SOS Untereinheit mit N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycin.

noch, weniger stark markiert, L6, L7/L12, L10, L11, L14 und L22 gefunden. Dies sind für ein spezifisches Markierungsreagens zu viele Proteine, und die Frage, die sich als nächstes stellt, ist, ob diese Markierungen, besonders bei den Hauptproteinen, echte Affinitätsmarkierungen oder nicht spezifische Alkylierungsreaktionen sind. Deshalb wurde als nächstes untersucht, mit welchen Proteinen N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin überhaupt zu reagieren vermag. Dazu wurden isolierte Proteine aus 50S Untereinheiten mit dem Reagens umgesetzt und die Proteine, wie oben beschrieben, untersucht.

4.4.2. Identifizierung der mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin umgesetzten Proteine der 50S Untereinheit

Die Umsetzung isolierter Proteine mit dem Affinitätsmarkierungsreagens ergab erwartungsgemäß einen sehr hohen Einbau an Radioaktivität. Zur Anfertigung der Autoradiogramme reichte deshalb eine kurze Belichtungszeit aus, was seinerseits auch zur Ausbildung klarer radioaktiver Flecken bzw. Banden führte.

Im jetzt folgenden Teil werden die zweidimensionalen Gelelektrophoresen nicht mehr getrennt behandelt, denn im großen und ganzen lieferten sie die gleichen Ergebnisse, obwohl eine genaue Zuordnung der Radioaktivität zu den einzelnen Proteinen manchmal nur durch einen Vergleich der Ergebnisse aus beiden Systemen möglich war.

4.4.2.1. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

Auf dem zweidimensionalen Gel findet man L2 als das am stärksten markierte Protein. Danach folgen, ebenfalls stark modifiziert, die Proteine L5, L6, L11 und L14, während L17, L27 (L28) weniger stark auftreten. L10 kann auf dem Autoradiogramm nur nach langer Belichtungszeit schemenhaft gesehen werden.

4.4.2.2. Immundoppeldiffusion nach Duchterlony

Die Immundoppeldiffusion bestätigt im großen und ganzen das Ergebnis, das mit der zweidimensionalen Polyacrylamidgелеlektrophorese gefunden wurde. Die Präzipitationslinie von L5 zeigt eine etwas geringere Radioaktivität, was auf die schwache Ausbildung der Linie im Agarosegel zurückzuführen ist. Protein L10, das in der zweidimensionalen Gelelektrophorese nur schwach markiert gefunden werden konnte, weist in der Immundoppeldiffusion eine deutlich stärkere Schwärzung auf. Ob L28 modifiziert worden ist, kann nicht festgestellt werden, da das entsprechende Antiserum unbekannt verunreinigt war.

4.4.2.3. Eindimensionale Celluloseacetatgelelektrophorese

Abbildung 10 zeigt neben der 30S- und 50S Proteinkontrolle die aufgetrennten markierten Proteine der 50S Untereinheit mit dem

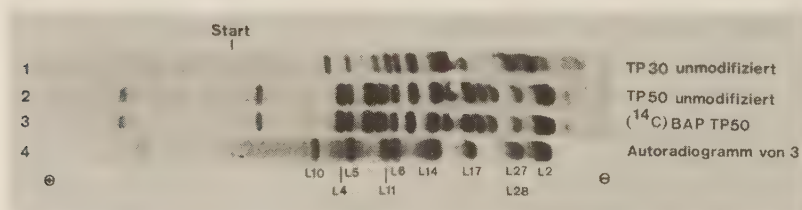


Abbildung 10: Celluloseacetatgelelektropherogramm. Spur 1: Proteine der 30S Untereinheit; Spur 2: Proteine der 50S Untereinheit; Spur 3: Mit N-Brom- (^{14}C) -acetylpuromycin umgesetztes Gesamtprotein der 50S Untereinheit; Spur 4: Autoradiogramm der Spur 3.

dazugehörigen Autoradiogramm. Alle Proteine, die mit den vorher beschriebenen Methoden als markiert identifiziert werden konnten, sind auch hier auf dem Autoradiogramm zu finden. Der Markierungsgrad von L14 ist fast ebenso stark wie der von L2, und auch L10 kommt in der eindimensionalen Gelelektrophorese stärker zum Vorschein als auf dem zweidimensionalen Gel, was damit das Ergebnis der immunologischen Methode bestätigt.

4.4.2.4. Zusammenfassung und Diskussion

Alle drei hier angewandten Methoden weisen L2 und L14 als die am stärksten markierten Proteine aus (Tabelle 5). Durchweg stark treten außerdem L5 (Ausnahme: Immundoppeldiffusion, wegen schwacher Präzipitationsbande), L6, L11, L17 und L27 auf. L10 kann zwar auch mit allen drei Methoden gefunden werden, gibt aber in der zweidimensionalen Gelelektrophorese nur eine geringe Schwärzung.

In der Tabelle 5 ist in der vorletzten Spalte zum Vergleich das Ergebnis der Affinitätsmarkierung und in der letzten die Anzahl der Cysteine angegeben, die in diesen Proteinen enthalten sind. Alle Proteine, die mindestens ein Cystein in ihrer Primärstruktur haben, werden durch N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin alkyliert, dabei zeigen die beiden Proteine mit zwei Cysteylresten im Autoradiogramm der Celluloseacetatgelelektrophorese die stärkste Schwärzung. Nicht untersucht werden konnten L28 (1Cystein) und L31, welches 4 Cysteylreste enthält. Die Wanderung von L31 in der Celluloseacetatgelelektrophorese ist nicht bekannt, und es stand auch kein Antiserum zur Verfügung. Weshalb L31 nicht als markiertes Protein gefunden werden kann, könnte also mit den für dieses Protein ungenügenden Identifizierungsmöglichkeiten zusammenhängen. Außerdem ist L31 auch in harnstoffhaltigen Puffern sehr schlecht löslich. Es könnte aber auch durch die vier möglichen Alkylierungen in seiner Wanderung sehr stark verändert sein.

Protein	2D	Oucht.	CAG	Ergebnis	BAP 50S	Cysteine
L1					++	0
L2	++++	+++	++++	++++	+++	2
L3						0
L4						0
L5	+++	+	+++	+++		1
L6	+++	++	+++	+++	+	1
L7/L12					+	0
L9						0
L10	+	++	++	++	+	1
L11	+++	+++	+++	+++	+	1
L13						0
L14	+++	++	++++	++++	+	2
L15						0
L16						0
L17	++	+++	++	++	++	1
L18						0
L19						0
L20						0
L21						0
L22					+	0
L23					+++	0
L24						0
L25						0
L26/S20						0
L27	++ (L28)	+++	++ (L28)	+++	+++	1
L28	++ (L27)	?	?	?	?	1
L29-L34						

? Protein ist nicht genau identifizierbar

(LX) Das in Klammern stehende Protein könnte ebenfalls für die Radioaktivität verantwortlich sein.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse: Umsetzung der isolierten Proteine der 50S Untereinheit mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin.

Mit Ausnahme von L5 werden alle Proteine, die ein Cysteylrest in ihrer Primärstruktur haben, auch innerhalb des Ribosoms markiert. Es stellt sich also die Frage, ob diese Proteine überhaupt echt affinitätsmarkiert werden. Deshalb wurden nun 50S Untereinheiten mit (^{14}C)-Jodacetamid, einem reinen Alkylierungsreagens, das ebenfalls vornehmlich mit Sulfhydrylgruppen reagiert, umgesetzt und die Proteine mit der in dieser Arbeit verwendeten Methoden untersucht. Zuvor sollte aber gezeigt werden, daß (^{14}C)-Jodacetamid mit isoliertem Protein aus 50S Untereinheiten ein vergleichbares Markierungsmuster ergibt wie N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin.

4.4.3. Identifizierung der mit (^{14}C)-Jodacetamid umgesetzten Proteine der 50S Untereinheit

In diesem Fall wurde zur Untersuchung der markierten Proteine keine zweidimensionale Gelelektrophorese angefertigt, sondern die Bestimmung nur mittels eindimensionaler Celluloseacetatgelelektrophorese und der Immundoppeldiffusion durchgeführt.

4.4.3.1. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony

Die Immundoppeldiffusion zeigt deutlich, daß beide Reagenzien die gleichen Proteine der 50S Untereinheit modifizieren. Leichte Unterschiede gibt es nur in den Schwärzungsintensitäten der Präzipitationslinien auf dem Autoradiogramm. Viel Radioaktivität findet man in den Proteinen L2, L6, L10, L11, L14, L17 und L27, während L5 etwas weniger stark markiert erscheint.

4.4.3.2. Celluloseacetatgelelektrophorese

Mit fast 30% der Radioaktivität ist L2 das hauptsächlich

markierte Protein (Abbildung 11). Etwas schwächer treten L5, L6, L14, L17 und L27 in Erscheinung, und deutlich geringer ist die Schwärzung von L10. Nach längerer Exposition kann man noch L4, L7/L12 und L15 sehen sowie die Bande, die L1, L3, L21 und L25 enthält. Die Intensitäten dieser Banden liegen aber deutlich unter 1% der Gesamtradioaktivität, so daß man sie bei der Beurteilung unberücksichtigt lassen kann.

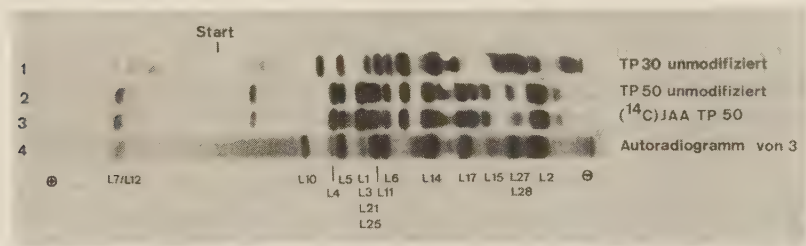


Abbildung 11: Celluloseacetatgelelektropherogramm. Spur 1: Proteine der 30S Untereinheit; Spur 2: Proteine der 50S Untereinheit; Spur 3: Mit (^{14}C)-Jodacetamid umgesetztes Gesamtprotein der 50S Untereinheit; Spur 4: Autoradiogramm der Spur 3.

4.4.3.3. Zusammenfassung und Diskussion

(^{14}C)-Jodacetamid und N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin reagieren mit den gleichen Proteinen bei ihrer Umsetzung mit isoliertem Protein der 50S Untereinheit (Tabelle 6, Spalte 3 und 4). Unterschiede findet man lediglich im Grad der Markierungen.

Protein	Ouchterlony	CAG	Ergebnis	BAP TP50
L1				
L2	+++	++++	++++	++++
L3				
L4				
L5	++	+++	+++	+++
L6	+++	+++	+++	+++
L7/L12				
L9				
L10	+++	++	++	++
L11	+++	+++	+++	+++
L13				
L14	+++	+++	+++	++++
L15				
L16				
L17	+++	+++	+++	++
L18				
L19				
L20				
L21				
L22				
L23				
L24				
L25				
L26/S20				
L27	+++ (L28)	+++	+++	+++
L28	+++ (L27)	?	?	?
L29-L34				

? Protein ist nicht genau identifizierbar

(LX) Das in Klammern stehende Protein könnte ebenfalls für die Radioaktivität verantwortlich sein.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse: Umsetzung der isolierten Proteine der 50S Untereinheit mit (^{14}C)-Jodacetamid.

So werden L2, L17 und L27 von (^{14}C)-Jodacetamid stärker modifiziert als vom Puromycinanalogon. Es ist also zu erwarten, daß man aus den Ergebnissen der Umsetzung mit dem Alkylierungsreagens innerhalb des Ribosoms Rückschlüsse ziehen kann, welche Proteine wirklich aufgrund ihrer besonderen Affinität zum Puromycinanalogon oder aber nur aufgrund besonders exponierter reaktiver Gruppen an der Ribosomenoberfläche markiert werden.

4.4.4. Identifizierung der (^{14}C)-Jodacetamid markierten Proteine der 50S Untereinheit von E. coli

4.4.4.1. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

Eindeutig am stärksten tritt Protein L2 im Autoradiogramm auf. Mit deutlichem Abstand folgen L17, L26/L27 und S18. Eine geringe Schwärzung auf dem Autoradiogramm geben die Proteine L6, L10, L11 und L23 sowie der mit L8 bezeichnete Komplex (L7/L12)₄L10.

4.4.4.2. Immundoppeldiffusion nach Duchterlony

Ausgewählte Immundoppeldiffusogramme sind in der Abbildung 12 zu sehen. Sie bestätigen, daß L2 das am stärksten markierte Protein ist. In Übereinstimmung mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese zeigen die Autoradiogramme der Präzipitationsbanden von L6, L10, L11, L17, L23 und L27 Schwärzungen, die aber deutlich unter der für das Protein L2 liegen.

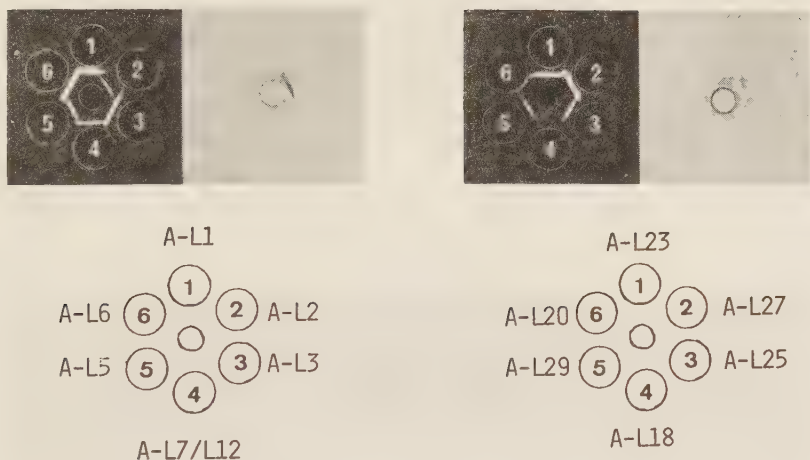


Abbildung 12: Ausgewählte Immunodiffusionsgramme von Proteinen der mit (^{14}C)-Jodacetamid umgesetzten 50S Untereinheit mit den dazugehörigen Autoradiogrammen.

4.4.4.3. Eindimensionale Celluloseacetatgelelektrophorese

Das Celluloseacetatgelelektropherogramm mit dem dazugehörigen Autoradiogramm ist in Abbildung 13 gezeigt. Hier wird ganz deutlich, daß L2 fast ausschließlich markiert wird. L17 und die Bande, in der L27 und L28 liegen, folgen mit großem Abstand. Nur noch schemenhaft sind auf dem Autoradiogramm die Banden der Proteine L6, L10, L11 und L23 zu sehen. Hier taucht jetzt die Bande der Proteine L14/L18/L30 auf. Keines der in dieser Bande wandernden Proteine wurde in der zweidimen-

sionalen Gelelektrophorese bzw. in der Immundoppeldiffusion markiert gefunden. Mit größter Wahrscheinlichkeit ist hier aber Protein L14 modifiziert, da dieses Protein sowohl im isolierten Zustand von (^{14}C)-Jodacetamid als auch innerhalb des Ribosoms vom Affinitätsanalogon markiert worden ist. L26, das sich schon in der zweidimensionalen Gelelektrophorese andeutete, zeigt in der Celluloseacetatgelelektrophorese eine ganz leichte Schwärzung.

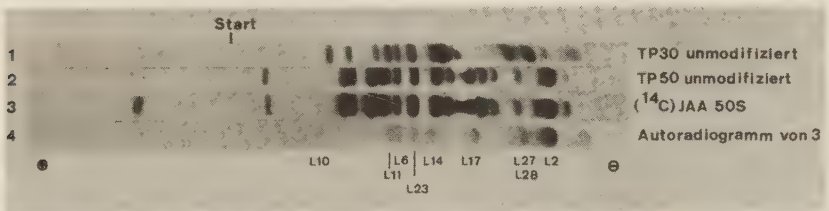


Abbildung 13: Celluloseacetatgelelektropherogramm. Spur 1: Proteine der 30S Untereinheit; Spur 2: Proteine der 50S Untereinheit; Spur 3: Proteine der mit (^{14}C)-Jodacetamid umgesetzten 50S Untereinheit; Spur 4: Autoradiogramm der Spur 3.

4.4.4.4. Zusammenfassung und Diskussion

Alle Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt. Übereinstimmend zeigen die drei Methoden, daß L2 weitaus am stärksten mit (^{14}C)-Jodacetamid markiert wird. L17 und L27 haben einen wesentlich geringeren Markierungsgrad, der sich aber noch von den schwach modifizierten Proteinen L6, L10, L11, L14, L23 und L26 abhebt. Außerdem wurde noch im Autoradiogramm der

Protein	2D	Duchterlony	CAG	Ergebnis	BAP 50S
L1					++
L2	+++	+++	+++	+++	+++
L3					
L4					
L5					
L6	+	+	+	+	+
L7/L12					+
L9					
L10	+	+	+	+	+
L11	+	+	+	+	+
L13					
L14			+	+	+
L15					
L16					
L17	++	++	++	++	++
L18					
L19					
L20					
L21					
L22					+
L23	+	+	+	+	+++
L24					
L25					
L26/S20	} ++		+	+	
L27		++	++ (L28)	++	+++
L28		?	?	?	?
L29-L34					

? Protein ist nicht genau identifizierbar

(LX) Das in Klammern stehende Protein könnte ebenfalls für die Radioaktivität verantwortlich sein.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse: Umsetzung der 50S Untereinheit mit (^{14}C)-Jodacetamid.

zweidimensionalen Gelelektrophorese der Fleck a gefunden, der von einer S18 Verunreinigung hervorgerufen wurde.

Bei der Umsetzung von 50S Untereinheiten mit (^{14}C)-Jodacetamid reagierten vornehmlich die Proteine, die ein Cystein in ihrer Primärstruktur haben. Ausnahmen sind L23 und L26/S20.

Im Vergleich zu dem Ergebnis der Affinitätsmarkierung findet man eine ganze Reihe von Proteinen, die mit beiden Reagenzien umgesetzt werden konnten (vgl. Tabelle 7 Spalte 4 und 5). Von den Hauptmarkierungsproteinen des Puromycinderivats läßt sich L2 beide Male stark modifizieren, L17 und L27 zeigen gegenüber den schwach markierten Proteinen mit (^{14}C)-Jodacetamid immer noch eine erhöhte Radioaktivität, während L23 mit dem Alkylierungsreagens nur noch schwach umgesetzt wird. Lediglich L1 reagiert innerhalb des Ribosoms nur mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin.

Da beide, Jodacetamid und das Puromycinanalog bei der Umsetzung von isoliertem Protein mit den gleichen Proteinen reagieren, kann man daraus schließen, daß auch diejenigen Proteine, die innerhalb des ribosomalen Verbands gleichermaßen modifiziert werden, von N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin alkyliert werden. Mit anderen Worten: diese Proteine werden nicht aufgrund der Affinität des Antibiotikums zum Peptidyltransferasezentrum markiert, sondern wegen besonders reaktionsfähiger Gruppen, die an der Oberfläche der 50S Untereinheit exponiert sind. Unter diesem Gesichtspunkt kann man streng genommen nur noch L1 als Affinitätsmarkierungsprotein betrachten und evtl. L23, das ja zu den Hauptmarkierungsproteinen von N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin zählt, aber mit (^{14}C)-Jodacetamid nur ganz schwach reagiert.

4.4.5. Identifizierung der N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin affinitätsmarkierten Proteine von E. coli 30S Untereinheiten

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche

Proteine am 70S Ribosom mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin reagieren, da es durchaus denkbar wäre, daß aufgrund der räumlichen Nähe auch Komponenten der kleinen Untereinheit markiert würden. Vorher soll aber auch noch ausführlich auf die Umsetzung von 30S Untereinheiten mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin eingegangen werden.

4.4.5.1. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

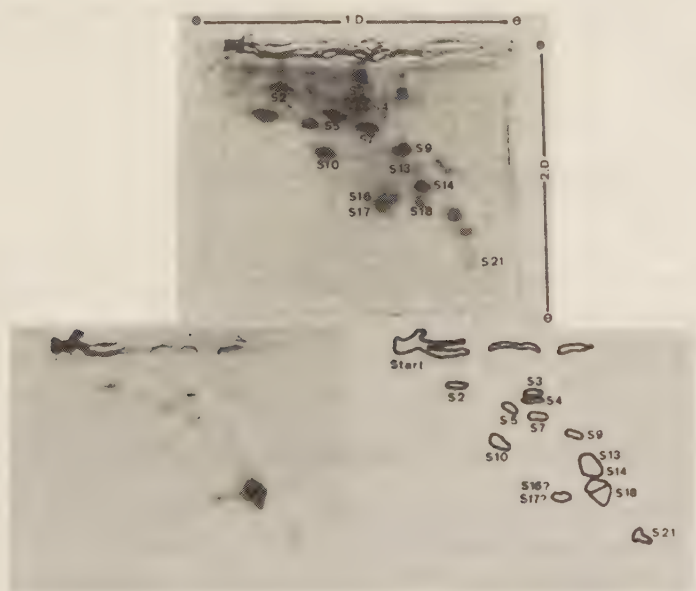


Abbildung 14: Zweidimensionales Polyacrylamidgelelektropherogramm nach der Methode von Geyl et al. im Mikromaßstab (oben) mit dem dazugehörigen Autoradiogramm (unten links) sowie einer schematischen Darstellung der radioaktiven Schwärzungen (unten rechts). Aufgetrennt wurden die Proteine der mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin umgesetzten 30S Untereinheit.

Auf dem Autoradiogramm des zweidimensionalen Gelelektrophogramms nach der Methode von Geyl et al. (Abbildung 14) sieht man dicht übereinander zwei Schwärzungen, die fast die ganze Radioaktivität der aufgetrennten Proteine ausmachen. Diese beiden Flecken müssen dem Protein S18 zugeordnet werden. Das Protein, das in seiner Sequenz ein Cystein enthält (Yaguchi, 1975), muß also mindestens zwei für das Markierungsreagens zugängliche Bindestellen haben, von denen die eine nach Modifizierung mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin die Ladung des Proteins verändert. Neben S18 findet man noch eine Reihe von Proteinen markiert, die aber nur ganz schwach in Erscheinung treten (vgl. Tabelle 8, Seite 80).

4.4.5.2. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony

Auch in der Immundoppeldiffusion kommt klar zum Ausdruck, daß S18 das am stärksten markierte Protein ist. Neben diesem gaben noch die Präzipitationslinien der Proteine S1, S2, S3, S4, S7, S10, S13, S14 und S21 im Autoradiogramm eine Schwärzung.

4.4.5.3. Eindimensionale Celluloseacetatgelelektrophorese

Die 30S Proteine zeigen im Gegensatz zu den 50S Proteinen in der Celluloseacetatgelelektrophorese eine größere Hintergrundstrahlung. Die meiste Radioaktivität findet sich in einer Bande, die etwas langsamer zur Kathode wandert als das unmarkierte Protein S18. In dieser Bande befinden sich auch die Proteine S11 und S19, die allerdings nach den Ergebnissen der zweidimensionalen Gelelektrophorese und der Immundoppeldiffusion nicht markiert sind. Die Radioaktivität in der Bande, in der S18 üblicherweise mit den Proteinen S9 und S13 läuft, ist demgegenüber relativ schwach.

Auch in der Celluloseacetatgelelektrophorese trennt sich das Protein S18 in zwei Banden auf, wobei der größte Teil des Proteins durch eine der Markierungen eine andere Wanderungsgeschwindigkeit erhält.

Wie in Tabelle 8 gezeigt, werden noch eine Reihe anderer Proteine schwach markiert gefunden.

4.4.5.4. Ergebnisse und Diskussion

Alle Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgeführt. Übereinstimmend zeigen alle Methoden, daß fast ausschließlich Protein S18 markiert wird. Die übrigen Proteine (S1, S2, S3, S4, S5, S7, S10, S13, S14 und S21) haben zusammen kaum 10% der Radioaktivität gebunden. Die Tatsache, daß sich S18 in der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese in zwei radioaktive Flecken auftrennt und auch in der Celluloseacetatgelelektrophorese zwei Banden gibt, spricht dafür, daß nicht nur das eine Cystein markiert wird, sondern auch noch eine weitere reaktive Seitenkette, deren Markierung die Gesamtladung des Proteins verändert. Für eine zweite Bindestelle spricht auch, daß der Markierungsgrad bei der Umsetzung von 30S Untereinheiten mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin 1,7 Mol pro Mol Untereinheiten betrug (vgl. Tabelle 2, Seite 45) und an die schwach markierten Proteine kaum 10% der Radioaktivität gebunden ist.

Da es unbestritten ist, daß das Peptidyltransferasezentrum Bestandteil der 50S Untereinheit ist, kann es sich bei der Umsetzung von 30S Untereinheiten mit dem Antibiotikum nur um Alkylierungsreaktionen handeln. Auch bei einer Umsetzung mit (^{14}C)-Jodacetamid reagiert fast ausschließlich Protein S18 (R.Bald, unveröffentlicht).

Nur in Verbindung mit der Analyse der in 70S Ribosomen markierten Proteine könnten Rückschlüsse gezogen werden, ob und welche Proteine der 30S Untereinheit im 70S Ribosom in der Nähe des Peptidyltransferasezentrums liegen.

Protein	2D	Duchterlony	CAG	Ergebnis
S1		+	+	+
S2	++	+	+	+
S3	+	+	+	+
S4	+	+	+ (S7)	+
S5	+		+	+
S6				
S7	+	+	+ (S4)	+
S8				
S9	+			
S10	+	+	+	+
S11				
S12				
S13	+	+	+ (S18)	+
S14	+	+	+	+
S15				
S16	+			
S17				
S18	++++	++++	++++	++++
S19				
S20				
S21	+	+	+	+

(SX) Das in Klammern stehende Protein könnte ebenfalls für die Radioaktivität verantwortlich sein.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Ergebnisse: Umsetzung der 30S Untereinheit mit N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycin.

4.4.6. Identifizierung der N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin affinitätsmarkierten Proteine von E. coli 70S Ribosomen

Für diese Experimente verwendete man 70S "tight couples", wie sie in Abschnitt 3.2.1. beschrieben wurden. Zu einem Teil wurden die mit dem Affinitätsmarkierungsreagens umgesetzten 70S Ribosomen direkt einer Essigsäureextraktion unterworfen und zu einem anderen Teil erst auf einem Saccharosegradienten in ihre Untereinheiten zerlegt, und anschließend die Proteine mit Essigsäure extrahiert. Hierbei zeigte sich, daß ca. 80% der Radioaktivität an die 30S Untereinheiten gebunden war.

4.4.6.1. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

In der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese wurde von den Proteinen der großen Untereinheit L23 am stärksten markiert. Mit Ausnahme von L14 lassen sich alle Proteine, die in der 50S Untereinheit modifiziert wurden, auch innerhalb des 70S Ribosoms umsetzen. Dabei waren L1, L2 und L27 im Vergleich zu den anderen 50S Proteinen meist über dem Durchschnitt stark markiert. Demgegenüber zeigte L17 keine besonders intensive Schwärzung auf dem Autoradiogramm.

Bei den Proteinen der 30S Untereinheit ist, wie bei der Umsetzung von isolierten 30S Untereinheiten, fast die gesamte Radioaktivität an Protein S18 gebunden. Schwach markiert waren S2, S3, S5, S7, S10, S21 sowie zwei Proteinpaaire, die nicht genau analysiert werden konnten (siehe Tabelle 9b). S1 wurde nicht gefunden, da es bei diesen Mikrogelen nicht in die zweite Dimension einläuft.

4.4.6.2. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony

Das Ergebnis der Immundoppeldiffusion bei 70S Ribosomen weicht etwas von dem für die Proteine der 50S Untereinheit ab. L2 und L23 werden eindeutig am stärksten, L1 und L27 aber nur durchschnittlich markiert. In den Präzipitationsbanden von L14 und L17 konnte überhaupt keine Radioaktivität gefunden werden. Alle übrigen Proteine, die in der isolierten 50S Untereinheit gefunden werden konnten (L6, L7/L12, L10, L11 und L22), waren auch innerhalb des Ribosoms markiert.

Die Untersuchungen mit den Antiseren gegen die 30S Proteine zeigten bei den 70S Ribosomen ein ähnliches Bild wie bei der Untereinheit. Auch hier findet man neben einer Reihe von schwach markierten Proteinen (vgl. Tabelle 9b) fast ausschließlich Radioaktivität im Protein S18.

4.4.6.3. Eindimensionale Celluloseacetatgelelektrophorese

Die Celluloseacetatgelelektrophorese der 70S Proteine hat wie die der 30S Proteine eine sehr große Hintergrundstrahlung, so daß es hier Schwierigkeiten bei der Interpretation des Autoradiogramms gab. Dennoch kann man sagen, daß im großen und ganzen auch hier dieselben Ergebnisse erhalten wurden wie bei der Analyse der beiden Untereinheiten (Tabelle 9a und b).

Bemerkenswert ist, daß die Banden von L17 und den Proteinen L14/L18/L30 keine Radioaktivität enthielten. Das bedeutet, daß L17, welches bei der Umsetzung der 50S Untereinheiten mit dem Puromycinanalogon zu den stärker markierten Proteinen zählte, bei der Umsetzung von 70S Ribosomen unmarkiert bleibt.

4.4.6.4. Ergebnisse und Diskussion

In den Tabellen 9 a und b findet man alle Ergebnisse der

Protein	2D	Ouchterlony	CAG	Ergebnisse	BAP 505
L1	++	+	+	+	++
L2	++	++	++	++	+++
L3					
L4					
L5					
L6	+	+	+	+	+
L7/L12	+	+	+	+	+
L9					
L10	+	+	+	+	+
L11	+	+	+	+	+
L13					
L14					+
L15					
L16					
L17	+				++
L18					
L19					
L20					
L21					
L22	+	+	+	+	+
L23	+++	++	++	++	+++
L24					
L25					
L26/S20					
L27	++	+	+	+	+++
L28	?	?	?	?	?
L29-L34					

Tabelle 9a

Protein	2D	Ouchterlony	CAG	Ergebnisse	BAP 30S
S1		+	+	+	+
S2	+	+	+	+	+
S3	+	+			+
S4		+	+ (S7)	+	+
S5	+	+		+	+
S6					
S7	+	+	+ (S4)	+	+
S8					
S9					
S10	+	+	+	+	+
S11					
S12					
S13	+	+	+ (S18)	+	+
S14		+	++	+	+
S15					
S16	+				
S17					
S18	++++	++++	++++	++++	++++
S19					
S20					
S21	+	+	+	+	+

? Protein ist nicht genau identifizierbar

(SX) Das in Klammern stehende Protein könnte ebenfalls für die Radioaktivität verantwortlich sein.

Tabelle 9b

Die Tabellen 9a und b geben eine Zusammenfassung der Ergebnisse von der Umsetzung der 70S Ribosomen mit N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycin.

Untersuchung von 70S Ribosomen. Obwohl man sagen kann, daß im großen und ganzen im 70S Ribosom die gleichen Markierungsproteine gefunden werden wie in den isolierten Untereinheiten, bestehen dennoch quantitative und qualitative Unterschiede. 80% der Radioaktivität waren in den 30S Untereinheiten zu finden, wobei fast ausschließlich S18 markiert war. Da die Umsetzung von isolierten 30S Untereinheiten und 70S Ribosomen mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin das gleiche Ergebnis liefert, kann man streng genommen daraus schließen, daß diese Proteine unspezifisch alkyliert werden und in keinem Zusammenhang mit dem Peptidyltransferasezentrum stehen. Nur 20% des Reagens hatten an die großen Untereinheiten gebunden. Hier waren im Gegensatz zur Umsetzung der 50S Untereinheiten mit dem Puro-mycinanalogon nur L23 und L2 stark markiert, während L1 und L27 wie auch alle anderen Proteine, die innerhalb der 50S Untereinheiten schwach modifiziert wurden, nur eine geringe Radioaktivität gebunden hatten. Bemerkenswert ist allerdings, daß L17, das ja innerhalb der 50S Untereinheiten zu den stärker markierten Proteinen zählt, und L14 innerhalb der 70S Ribosomen nicht umgesetzt werden konnten.

4.4.7. Diskussion der Ergebnisse der Affinitätsmarkierung mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin an 70S Ribosomen und 50S Untereinheiten von E.coli

Betrachtet man die Ergebnisse, die man bei der Analyse der mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin umgesetzten Proteine von 70S Ribosomen erhalten hat, so könnte man nur L2 und L23 als Hauptmarkierungsproteine der 50S Untereinheit bezeichnen. L1 und L27 haben in diesem Experiment nur eine schwache Radioaktivität gebunden, während L17 völlig unmarkiert blieb. Diese fünf Proteine wurden allerdings bei der Umsetzung der isolierten 50S Untereinheiten, dessen Bestandteil das Peptidyltransferasezentrum ist, mit dem Affinitätsanalogon am stärksten markiert.

Deshalb soll in der folgenden Diskussion auch auf alle fünf Proteine eingegangen werden. Neben diesen findet man noch sieben Proteine schwach markiert; sicherlich zu viel für ein spezifisches Affinitätsmarkierungsreagens. Vergleicht man diese große Zahl von Proteinen mit anderen in der Literatur beschriebenen Experimenten zur Affinitätsmarkierung des Peptidyltransferasezentrums, so findet man häufig mit den verschiedensten Reagenzien eine ähnlich hohe Zahl an Proteinen wie in der vorliegenden Arbeit. Als Beispiele sollen hier die Arbeiten von Nicholson und Cooperman (1978) dienen, die mit dem Photoaffinitätsreagens p-Azidopuromycin ein Hauptprotein sowie fünf schwächer markierte Proteine fanden. Krassnigg et al. (1978) geben mit dem gleichen Puromycinanalogon fünf stärker und vier schwächer markierte L-Proteine an. Nicht anders sieht das bei Untersuchungen mit Affinitätsanalogon der tRNA aus. So finden Oen et al. (1973) für ihr P-site Reagens N-Bromacetylphenylalanyl-tRNA zwei Haupt- sowie acht Nebenproteine. Offensichtlich haben andere Autoren ähnliche Probleme mit unspezifischen Reaktionen. In vielen Fällen wird darüber aber hinweggegangen. In einer neueren Arbeit haben Nicholson und Mitarbeiter (1982) unspezifische Bindungen bei der Photoaffinitätsmarkierung mit p-Azido-(^3H)-puromycin durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol unterdrückt. Unspezifisch markierte ribosomale Komponenten können aber auch mit Hilfe von ausführlichen Kontrollexperimenten eliminiert werden, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden.

Tabelle 10 enthält alle Ergebnisse, die mit dem Affinitätsmarkierungsreagens und (^{14}C)-Jodacetamid bei 50S Untereinheiten bzw. isoliertem 50S Protein gefunden wurden. Ganz klar kommt heraus, daß L1 (im Mittel 10%), L2 (15%), L17 (9%), L23 (13%) und L27 (18%) die Hauptmarkierungsproteine mit N-Bromacetylpuromycin sind, wobei allerdings die Radioaktivität von L1 in den vier hier durchgeführten Umsetzungen variiert (vgl. Abschnitt 4.4.1.4. Seite 62). Die fünf Hauptproteine lassen sich in drei Gruppen einteilen:

Protein	Cysteine	BAP 50S	JAA 50S	BAP TP50	JAA TP50
L1	0	++			
L2	2	+++	+++	++++	++++
L3	0				
L4	0				
L5	1			+++	+++
L6	1	+	+	+++	+++
L7/L12	0	+			
L9	0				
L10	1	+	+	++	++
L11	1	+	+	+++	+++
L13	1				
L14	2	+	+	++++	+++
L15	0				
L16	0				
L17	1	++	++	++	+++
L18	0				
L19	0				
L20	0				
L21	0				
L22	0	+			
L23	0	+++	+		
L24	0				
L25	0				
L26/S20	0		+		
L27	1	+++	++	+++	+++
L28	1	?	?	?	?
L29-L34					

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse aller Umsetzungen von 50S Untereinheiten sowie isoliertem Protein der 50S Untereinheit mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin und (^{14}C)-Jodacetamid.

- 1) L1, das nur vom Affinitätsmarkierungsreagens und nur innerhalb der 50S Untereinheit getroffen wird
- 2) L2, L17 und L27, die innerhalb der 50S Untereinheit und in isolierter Form sowohl von N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin als auch (^{14}C)-Jodacetamid modifiziert werden und
- 3) L23, das von beiden Reagenzien nur innerhalb des ribosomalen Verbands markiert wird.

L1 reagiert innerhalb der 50S Untereinheit nicht mit (^{14}C)-Jodacetamid, das wie das N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin vornehmlich Sulfhydrylgruppen alkyliert, ohne jedoch eine Affinität zum Peptidyltransferasezentrum zu besitzen. Das Puromycinderivat zeigt, daß prinzipiell für die Haloacylgruppe eine Bindungsmöglichkeit an das Protein besteht, obwohl L1 kein Cystein besitzt (Brauer und Öchsner, 1978). Da sich aber nur zwischen N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin und L1 eine kovalente Bindung ausbildet, kann man daraus folgern, daß dieses Protein in irgendeiner Weise zum Peptidyltransferasezentrum gehört oder zumindest in dessen unmittelbarer Nähe liegt. Diese Annahme wird durch die zweite Kontrolle erhärtet. Bei der Umsetzung von isoliertem 50S Protein mit dem Affinitätsmarkierungsreagens wie auch mit (^{14}C)-Jodacetamid wird L1 ebenfalls nicht markiert. Also auch im isolierten Zustand, in dem die Aminosäureseitenketten der Proteine besser zugänglich sein sollten, findet keine Modifizierung statt.

L2, L17 und L27 werden innerhalb der 50S Untereinheit sowohl von N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin als auch von (^{14}C)-Jodacetamid stark markiert. Diese Proteine haben in ihrer Primärstruktur ein Cystein bzw. 2 Cysteine im Fall von L2 (Kimura et al., 1982; Rombauts et al., 1982; Chen et al., 1975), die sich wahrscheinlich innerhalb der 50S Untereinheit gut markieren lassen. Auch im isolierten Zustand werden diese Proteine von den Reagenzien modifiziert. Aus diesen Kontrollen heraus kann man den Schluß ziehen, daß diese drei Proteine nicht aufgrund ihrer Zugehörigkeit bzw. Nachbarschaft zum Peptidyltransferasezentrum markiert worden sind, sondern, daß es sich hier um reine

Alkylierungsreaktionen handelt. Allerdings bedeutet dies nicht unbedingt, daß diese Proteine keine Rolle für die Aktivität der Peptidyltransferase spielen. Es wäre auch durchaus möglich, daß ein Cysteylrest in einem oder mehreren Proteinen in der Nähe des aktiven Zentrums liegt.

L23 hingegen zeigt ein abweichendes Verhalten. Dieses Protein, das wie L1 kein Cystein besitzt (Wittmann-Liebold und Greuer, 1979), wird innerhalb des ribosomalen Verbands vom Affinitätsmarkierungsreagens stark, vom Alkylierungsreagens hingegen schwach markiert, während es als isoliertes Protein unmarkiert bleibt. Beide Reagenzien binden hier nicht an eine Sulphydrylgruppe, sondern an irgendeine andere Aminosäure mit einer reaktiven Seitenkette. Es bestände nun die Möglichkeit, daß diese Seitengruppe im isolierten L23 nicht zugänglich ist, da die Reaktion mit beiden Reagenzien unter denaturierenden Bedingungen vorgenommen worden ist. Innerhalb des Ribosoms aber könnte durch die intakte Tertiär- bzw. Quaternärstruktur diese reaktive Seitengruppe exponiert sein. Die Tatsache aber, daß dieses Protein mit dem Affinitätsanalog wesentlich stärker reagiert als mit dem Alkylierungsreagens, spricht für eine besondere Affinität des Puromycinderivats zum Protein L23 innerhalb des Ribosoms.

Zu den weniger stark modifizierten Proteinen zählen L6, L7/L12, L10, L11, L14 und L22 (L28 konnte mit den hier angewandten Methoden nicht zweifelsfrei untersucht werden). Man sollte bei der Beurteilung dieser Proteine, deren Modifizierungsgrad höchsten 5% beträgt, vorsichtig sein und ihnen nicht allzu viel Bedeutung beimessen, da die eine oder andere Markierung, z.B. auch durch die jeweils angewandte Methode der Ribosomenpräparation, begünstigt oder sogar erst möglich geworden ist. Dennoch soll kurz auf die modifizierten Proteine eingegangen werden. Man kann sie in drei Gruppen unterteilen: 1. Die Proteine, die sowohl im ribosomalen Verband als auch als isoliertes Protein mit beiden in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien markiert werden, dieses sind L6, L10, L11 und L14. Alle diese

Proteine haben in ihrer Sequenz ein Cystein (L14 zwei Cysteine, vgl. Tabelle 10), das wahrscheinlich innerhalb des Ribosoms und im isolierten Protein zugänglich ist. 2. Proteine, die nur innerhalb des ribosomalen Verbands und nur mit N-Brom- (^{14}C)-acetylpuromycin markiert werden. Dies sind L7/L12 und L22. Diese Proteine besitzen keine Sulfhydrylgruppen (Tabelle 10). Sicherlich könnte es sich hier um echte Affinitätsmarkierungen handeln. Es wäre denkbar, daß die reaktiven Aminosäureseitenketten innerhalb des Ribosoms schwer zugänglich sind und daß die Möglichkeit, mit dem Puromycinanalog zu reagieren, überhaupt eingeschränkt ist. Für diese Argumentation spricht, daß L7/L12 und L22 innerhalb der 50S Untereinheiten nicht mit (^{14}C)-Jodacetamid reagieren, obwohl beide Reagenzien mit isoliertem Protein aus 50S Untereinheiten nahezu identisch reagieren. Dennoch kann man die Proteine L7/L12 und L22 nur mit Vorbehalt zu den affinitätsmarkierten zählen. 3. In die letzte Gruppe gehört das Protein L5, dem aber keine Bedeutung zukommt. Es besitzt eine SH-Gruppe, die innerhalb des ribosomalen Verbands für beide Reagenzien nicht zugänglich ist, sondern nur im isolierten Protein markiert werden kann.

Neben den Proteinen wurde auch die RNA der 50S Untereinheit markiert. Und zwar betrug ihre Radioaktivität ca. 15-20% der Gesamtradioaktivität. Das Autoradiogramm des RNA-Polyacrylamidgels ergab Schwärzungen, die sowohl von der 23S- als auch von der 5S RNA stammten. Die RNA der mit (^{14}C)-Jodacetamid umgesetzten 50S Untereinheiten war insgesamt zu gering markiert, um Aufschlüsse darüber zu geben, ob neben der 23S RNA auch die 5S RNA modifiziert worden war. Aus den Daten, die aus der Markierung der Proteine von 70S Ribosomen und 30S Untereinheiten erhalten wurden (vgl. Tabelle 9, Seite 84), konnten unter Einbeziehung der hier aufgestellten Kriterien keine Hinweise auf Affinitätsmarkierungen bei den Proteinen der kleinen Untereinheit gefunden werden. Neben einer Reihe schwach markierter Proteine trägt S18 fast die ganze Radioaktivität.

Aus allen hier durchgeführten Experimenten kann man folgern, daß L1, L23 und von den schwach markierten Proteinen unter Vorbehalt L7/L12 und L22 aufgrund ihrer Zugehörigkeit oder ihrer unmittelbaren Nähe zum Peptidyltransferasezentrum markiert worden sind. Für die anderen Hauptmarkierungsproteine nämlich gibt es keine Hinweise, daß es sich dabei um reine Affinitätsmarkierungen handelt. Dennoch sollen auch sie beim Vergleich mit den in der Literatur vorhandenen Daten zur Lokalisierung des Peptidyltransferasezentrums mit einbezogen werden, denn es könnte ja auch ein reaktives Cystein in der Nähe des aktiven Zentrums liegen.

In Tabelle 11 wird gezeigt, welche der Komponenten, die sich mit N-Bromacetylpuromycin stark modifizieren lassen, auch von anderen Autoren mit Puromycin und seinen Affinitätsanalogen markiert gefunden werden konnten. L23 ist dasjenige Protein, welches in der Photoaffinitätsmarkierung mit Puromycin und seinen Derivaten häufig gefunden wird (vgl. auch Tabelle 1, Seite 19). So reagieren Puromycin selbst (Jaynes et al., 1978) und p-Azido-Puromycin (Nicholson et al., 1982) vornehmlich mit diesem Protein. Krassnigg et al. (1978) konnten p-Azidopuromycin allerdings nur in geringem Maße an L23 gebunden finden. Das Derivat BAP-Pan-Phe (Greenwell et al., 1974), das auf chemischem Wege mit den Komponenten des Ribosoms reagiert, modifiziert hingegen die 23S RNA. Alle drei Reagenzien markieren die A-site des Peptidyltransferasezentrums. N-Bromacetylpuromycin allerdings bindet an die P-site. Hier gibt es Experimente von Pongs und Mitarbeitern, die für N-Jodacetylpuromycin L6 und weniger stark L2 markiert fanden (Pongs et al., 1974). Obwohl beide Affinitätsanaloge die gleichen Eigenschaften haben, stimmen die Ergebnisse nicht gut überein. In diesem Zusammenhang stellt sich natürlich die Frage, in wieweit unterschiedliche Identifizierungsmethoden hierauf ihren Einfluß hatten (siehe Abschnitt 4.4.1.5., Seite 63).

Nach diesen Vergleichen der mit N-Bromacetylpuromycin mar-

Reagens	L1	L2	L17	L23	L27	23S
<u>Puromycin</u>						
Jaynes et al., 1978				++		++ [§]
<u>p-Azido-Puromycin</u>						
Nicholson und Cooperman, 1978		+	+		+	
<u>p-Azido-Puromycin</u>						
Krassnigg et al., 1978				+	+	
<u>p-Azido-Puromycin</u>						
Nicholson et al., 1982				++		
<u>BAP-Pan-Phe</u>						
Greenwell et al., 1974						++
<u>N-Jodacetylpuromycin</u>						
Pongs et al., 1974		+				
++ Hauptmarkierungsproteine						
+ Nebenproteine						
§ RNA50 (RNA der 50S Untereinheit wurde nicht genauer untersucht.)						

Tabelle 11: Vergleich zwischen den Hauptmarkierungsproteinen von N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycin und den Ergebnissen anderer Autoren mit Puromycin und seinen Affinitätsanalogen.

kierten Proteine mit anderen Affinitätsmarkierungen lassen sich sehr viele Übereinstimmungen finden. Lediglich L1 konnte mit keinem anderen Affinitätsanalogon des Puromycins markiert gefunden werden. Interessant ist es in dem Zusammenhang, daß dieses Protein von Le Goffic und Mitarbeitern (1980) mit Chloramphenicol als Photoaffinitätsmarkierungsreagens markiert worden ist (vgl. Abschnitt 4.6.3. Seite 104).

Von Lührmann et al. (1981) wurde die Bindestelle von N-Bromace-

tylpuromycin an der 50S Untereinheit mit einem spezifischen Antikörper gegen N^6, N^6 -Dimethyladenosin, der mit Puromycin kreuzreagiert, im Elektronenmikroskop untersucht. Diese Stelle wurde auf der großen lateralen Protuberanz lokalisiert und zwar dort, wo mit Protein-spezifischen Antikörpern eindeutig L1 gefunden werden konnte (Dabbs et al., 1981). Abbildung 15 zeigt die Antikörperbindestelle von L1 im Vergleich mit der

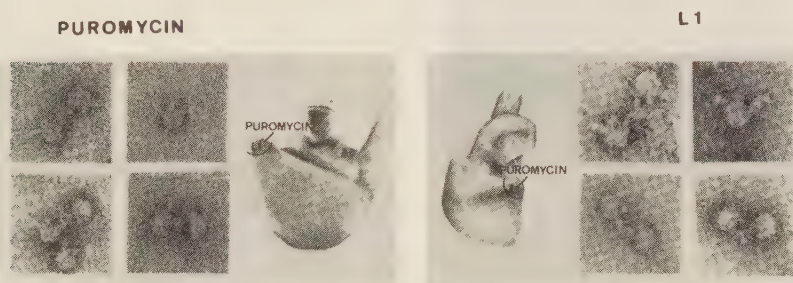


Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen affinitätsmarkierter 50S Untereinheiten mit einem Antikörper gegen N^6, N^6 -Dimethyladenosin (links) und 50S Untereinheiten mit einem Antikörper gegen L1 (rechts). In der Mitte sieht man ein dreidimensionales Modell der 50S Untereinheit mit den Bindestellen dieser Antikörper.

des Puromycins. Von McKuskie-Olson et al. (1982) wurden ähnliche Experimente durchgeführt. Sie untersuchten 50S Untereinheiten, die mit (^3H) -Puromycin, das hauptsächlich an L23 bindet, photoaffinitätsmarkiert waren. Die Bindestelle des N^6, N^6 -Dimethyladenosin Antikörpers konnten sie in dem Bereich zwischen der großen lateralen und der zentralen Protuberanz lokalisieren. Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen an 30S Untereinheiten, die ebenfalls mit (^3H) -Puromycin photoaffinitätsmarkiert waren, zeigten S14 als N^6, N^6 -Dimethyladenosinbindestelle (McKuskie-Olson et al., 1980). Abbildung 16

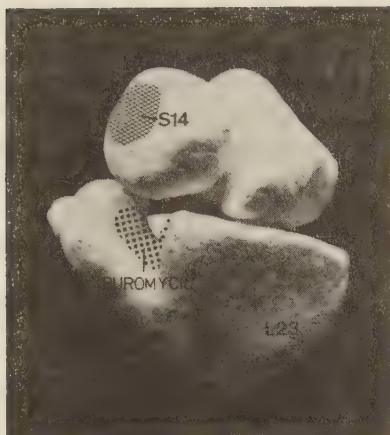
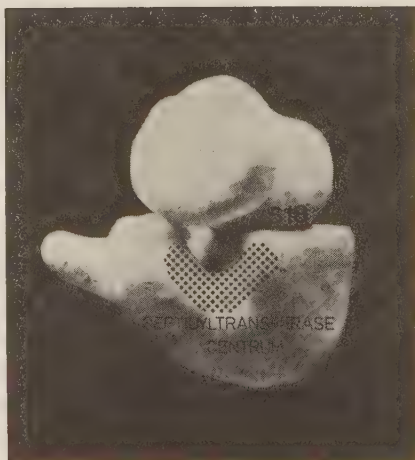


Abbildung 16: Bindestelle des N^6, N^6 -Dimethyladenosin-Antikörpers an (^3H) -Puromycin markierte 30S und 50S Untereinheiten nach den Ergebnissen von McKuskie-Olson et al.

Abbildung 17: Elektronenmikroskopisch lokalisierte Bindestelle des Antikörpers gegen Protein S18 am großen Lappen der kleinen Untereinheit.



faßt die Ergebnisse der Untersuchungen von McKuskie-Olson et al. zusammen. Die mit den Antikörpern bestimmte Bindestelle an der 50S Untereinheit liegt an der Grenzfläche zwischen beiden Untereinheiten und stimmt mit den Ergebnissen von Lührmann et al. gut überein, obwohl beide Affinitätsanaloge unterschiedliche Komponenten markieren, und eine antigene Determinante des Proteins L23, das das Hauptmarkierungsprotein von (^3H)-Puromycin ist, von der Arbeitsgruppe Stöffler weit ab vom Peptidyltransferasezentrum lokalisiert wurde (vgl. Abbildung 1, Seite 7). Es wäre somit denkbar, daß der verwendete Antikörper nicht an das Puromycin in Protein L23 gebunden war, sondern an die RNA bzw. ein anderes Protein, die ebenfalls mit Puromycin umgesetzt worden sind.

Protein S14, die Bindestelle von Puromycin an die 30S Untereinheit, ist durch die Masse des Kopfes der kleinen Untereinheit vom Peptidyltransferasezentrum entfernt. An den 70S Modellen von Kastner (1982) und Lake (1979) liegt Protein S14 übereinstimmend an der dem Cytoplasma zugewandten Seite, so daß wegen der räumlichen Distanz zu den Proteinen der 50S Untereinheit eine Markierung aufgrund der Affinität des Puromycins zum Peptidyltransferasezentrum unwahrscheinlich ist. Außerdem wurde die Photoaffinitätsmarkierung an isolierten 30S Untereinheiten vorgenommen, obwohl das Peptidyltransferasezentrum anerkannter Maßen auf der großen Untereinheit zu finden ist.

Im Zusammenhang mit den elektronenmikroskopischen Untersuchungen soll noch einmal auf das Protein S18 eingegangen werden, das nach den Affinitätsmarkierungsergebnissen an 30S Untereinheiten und 70S Ribosomen überaus stark mit N-Bromacetylpuromycin umgesetzt wird. Abbildung 17 zeigt, daß die Markierung von Protein S18 durch das Puromycinanaloge auf einer unspezifischen Alkylierung beruhen sollte. S18 wurde am großen Lappen der kleinen Untereinheit lokalisiert. Das Protein liegt nach den Ergebnissen vieler Versuche an der Decodierstelle der 30S Untereinheit. Daß die RNA-Bindestelle in dieser Region liegt,

konnte z. B. unabhängig voneinander von mehreren Arbeitsgruppen durch die Lokalisationen des 3'-Endes der 16S RNA und der beiden Dimethyladenosine in Position 24 und 25, vom 3'-Ende her gezählt, am großen Lappen gezeigt werden. (Literatur bei Stöffler und Stöffler-Meilicke, 1981). Das CCA-Ende der tRNA kann folglich nicht an dieser Stelle liegen. Eine Nachbarschaft zwischen tRNA und S18 ist nur über den Anticodonloop zu erwarten. Das bedeutet; die Lage von S18 im 70S Ribosom bestätigt die in Kapitel 4.4.6.4., Seite 85 gemachte Annahme, daß die Markierung von S18 mit dem Affinitätsanalogon auf einer unspezifischen Alkylierung beruht.

4.5. Affinitätsmarkierung von E. coli 50S Untereinheiten mit (^{14}C)-Jodamphenicol

Im zweiten Teil der Arbeit, der in Zusammenarbeit mit Dr. Rolf Bald durchgeführt wurde, sollten 50S Untereinheiten mit (^{14}C)-Jodamphenicol umgesetzt und die ribosomalen Komponenten nach den gleichen Kriterien untersucht werden, wie es für N-Brom-acetylpuromycin gemacht wurde. Zum Unterschied vom Puromycin-analogen handelt es sich beim Jodamphenicol um ein spezifisches A-site Reagens (Pongs et al., 1973), das zu den chemischen Markern und speziell zu den Haloacylaffinitätsreagenzien zählt.

Obwohl schon Untersuchungen mit dem Chloramphenicolanalogen Jodamphenicol (Pongs et al., 1973) und Bromamphenicol (Sonenberg et al., 1973) durchgeführt wurden, ist eine neuerliche Untersuchung doch lohnend, da erstens beide Arbeitsgruppen völlig unterschiedliche Ergebnisse erhalten haben (vgl. Abschnitt 1.4.2., Seite 20) und zweitens die Identifizierungsmethoden nach der in dieser Arbeit vertretenen Meinung unzureichend waren. Denn beide Arbeitsgruppen verwendeten zur Identifizierung der markierten ribosomalen Komponenten lediglich die zweidimensionale Gelelektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann. Sie fertigten außerdem keine Autoradiogramme an, sondern schnitten die angefärbten Proteinflecken mit ihrer Umgebung aus dem Gel heraus und zählten sie im Szintillationszähler.

4.5.1. Umsetzung von E. coli 50S Untereinheiten mit (^{14}C)-Jodamphenicol

Das nach der Methode von Bald et al. (1972) synthetisierte (^{14}C)-Jodamphenicol wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Bald für diese Experimente zur Verfügung gestellt. In insgesamt neun Versuchen wurden E. coli 50S Untereinheiten so, wie es für die

Umsetzung mit (^{14}C)-Jodacetamid in Abschnitt 3.4.3. beschrieben ist, mit (^{14}C)-Jodamphenicol affinitätsmarkiert. Der Einbau lag zwischen 0,1 und 0,6 Mol pro Mol 50S Untereinheiten. Davon wurden 85-95% des Reagens an die Proteine gebunden, während 5-15% mit der RNA reagierten. Die RNA wurde auf einem 5% Polyacrylamidgel aufgetrennt, und von dem getrockneten Gel ein Autoradiogramm angefertigt. Auf diesem konnte nur Radioaktivität in der 23S RNA nachgewiesen werden, nicht jedoch in der 5S RNA Bande.

4.5.2. Identifizierung der mit (^{14}C)-Jodamphenicol markierten ribosomalen Proteine von 50S Untereinheiten

Abbildung 18 zeigt das Gel einer zweidimensionalen Elektro-

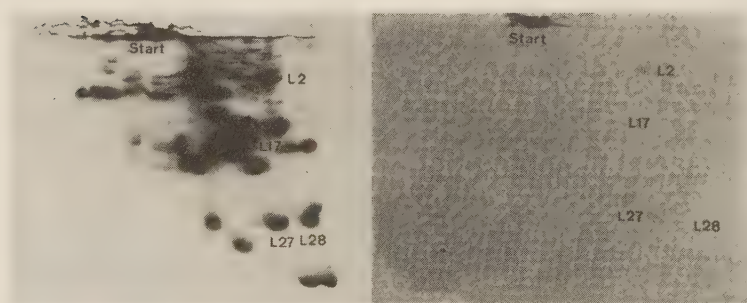
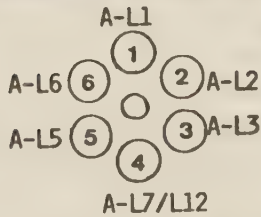
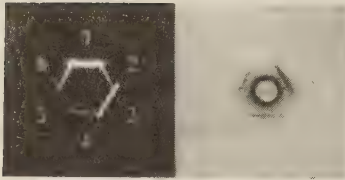


Abbildung 18: Zweidimensionales Polyacrylamidgelelektropherogramm nach der Methode von Kaltschmidt und Wittmann im Mikromaßstab (links) mit dem dazugehörigen Autoradiogramm (rechts). Aufgetrennt wurden die Proteine der mit (^{14}C)-Jodamphenicol affinitätsmarkierten 50S Untereinheit.

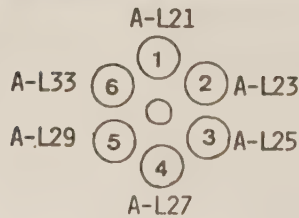
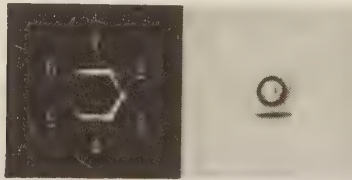
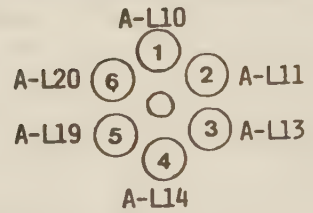
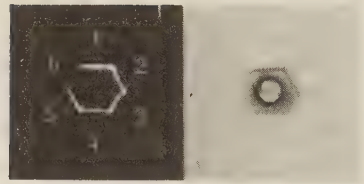
phorese nach Kaltschmidt und Wittmann mit dem dazugehörigen Autoradiogramm. Wegen der kurzen Exposition sind auf ihm nur die am stärksten markierten Proteine zu sehen. Das sind in der Reihenfolge ihrer Intensitäten L2, L27, L17 und L28. Nach einer längeren Belichtungszeit wurden auch die weniger stark markierten Proteine sichtbar. Im Vergleich mit der Immundoppeldiffusion (in Abbildung 19 ausgewählte Beispiele) konnten diese Proteine zweifelsfrei zugeordnet werden, und zwar L6, L7/L12, L10, L11, L13, L14 und L23. Wie man aus den Immunodiffusogrammen erkennen kann, zeigen die Proteine L2 und L27 die stärksten Schwärzungen in den Präzipitationsbanden, während L17 im Gegensatz zur zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese schwächer erscheint (L28 konnte immunologisch nicht untersucht werden). L1 (Rosette 1, Position 1), das bei der Affinitätsmarkierung mit dem Puromycinderivat zu den am stärksten modifizierten Proteinen zählt, gibt hier in der Immundoppeldiffusion keine Schwärzungslinie. L23 (Rosette 3, Position 2) erscheint nur schwach auf dem Autoradiogramm. Obwohl die Proteine in der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese und der Immundoppeldiffusion ein einheitliches Markierungsmuster aufwiesen, erschienen je nach Präparation einzelne Proteine in der Celluloseacetatgelelektrophorese mit unterschiedlich starker Radioaktivität. In Abbildung 20 sind in den Spuren 4 und 5 die Autoradiogramme von Läufen zweier unterschiedlicher Präparationen gezeigt. Obwohl die 50S Untereinheiten nach den gleichen Bedingungen umgesetzt worden sind, weist in der Spur 5 die Bande, in der L13 und L23 liegen, eine enorme Schwärzung auf aber eine geringe Radioaktivität in einer Bande, die L26 zugeordnet werden muß. Umgekehrt ist dies beim Gesamtprotein aus 50S Untereinheiten in Spur 4. Hier tritt die Bande L13/L23 weniger kräftig, dafür aber L26 relativ stark auf.

Im Falle der beiden Proteine L13 und L23 konnte mit den drei bisher angewandten Methoden zur Identifizierung der markierten Proteine nicht festgestellt werden, welches der beiden für die

Rosette 1



Rosette 2



Rosette 3

Abbildung 19: Ausgewählte Immunodiffusogramme von Proteinen der mit (^{14}C)-Jodamphenicol affinitätsmarkierten 50S Unter-einheit mit den dazugehörigen Autoradiogrammen.

starke Radioaktivität in der Spur 5 verantwortlich ist. Deshalb wurde zusätzlich eine Immunelektrophorese angefertigt. Und zwar wurde der Celluloseacetatstreifen nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in das entsprechende Antiserum (Anti-L13 und Anti-L23) getaucht (Zubke et al., 1977; Cundliffe et al., 1979; Wienen et al., 1979). Nach dem Auswaschen des Überschüssigen Serums und der nicht präzipitierten Proteine wurde das Immunpräzipitat auf dem Gel angefärbt und durch Autoradiographie untersucht. Dadurch konnte gezeigt werden, daß fast die ganze Radioaktivität an Protein L13 und nur in geringen Mengen an L23 gebunden war. Auf die gleiche Weise wurde gezeigt, daß die Schwärzung der Bande L27/L28 hauptsächlich vom Protein L27 stammt und L28 nicht sehr stark markiert ist, anders als es nach der zweidimensionalen Gelelektrophorese den Anschein hatte.

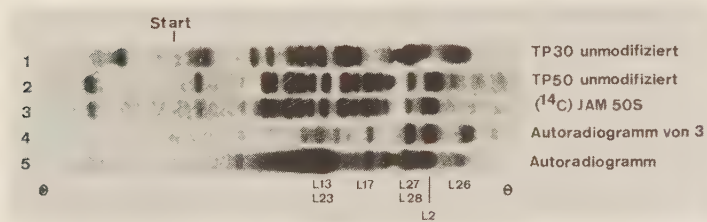


Abbildung 20: Celluloseacetatgelelektropherogramm. Spur 1: Proteine der 30S Untereinheit; Spur 2: Proteine der 50S Untereinheit; Spur 3: Proteine von (¹⁴C)-Jodamphenicol affinitätsmarkierten 50S Untereinheiten; Spur 4 und 5: Autoradiogramme von Proteinen affinitätsmarkierter 50S Untereinheiten zweier Umsetzungen.

L13 und L26 weisen eine starke Variabilität auf. Beide Proteine lassen sich zwar in jeder Umsetzung finden, aber im Falle von L13 lag der Markierungsgrad zwischen 10% und 25% (das in Abbildung 20, Spur 5 gezeigte Beispiel stellt eine Ausnahme dar), während L26 eine Radioaktivität von unter 5%-18% aufwies. Es ist natürlich schwer zu sagen, wie diese enormen Unterschiede in der Markierung zustande kommen. Für Protein L26 läßt sich vermuten, daß bei unterschiedlichen Ribosomenpräparationen das Verteilungsverhältnis dieses Proteins, das ja normalerweise bei der Auftrennung der 70S Ribosomen in ihre Untereinheiten zu 20% auf der 50S- und zu 80% auf der 30S Untereinheit verbleibt, unterschiedlich ist.

Die Markierung von L2 lag bei ca. 20%, die Bande, in der L27 zusammen mit L28 liegt, hatte ebenfalls einen Markierungsgrad von ungefähr 20%. Alle übrigen Proteine wiesen mit Ausnahme von L17 (7%) eine Markierung zwischen 1% und 5% auf.

4.5.3. Diskussion der Ergebnisse der Affinitätsmarkierung mit Jodamphenicol und N-Bromacetylpuromycin an 50S Untereinheiten von E. coli

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse zusammengefaßt, die man bei der Umsetzung von 50S Untereinheiten mit Jodamphenicol und N-Bromacetylpuromycin erhielt. Obwohl beide Reagenzien ihren Wirkungsort an unterschiedlichen Stellen haben (Jodamphenicol an der A-site, N-Bromacetylpuromycin an der P-site), werden im großen und ganzen die gleichen Komponenten markiert. Unterschiede gibt es allerdings im Markierungsgrad der einzelnen Komponenten. So werden L2 und L27 sowie die 23S RNA von beiden Affinitätsanalogen stark modifiziert, während L23 mit dem Puromycinderivat stark, aber mit Jodamphenicol nur schwach reagiert. L1, L13 und L26/S20 konnten jeweils nur mit einem der untersuchten Reagenzien markiert werden.

L13 und L26/S20 sind zwei Proteine, die wie L1 und L23 kein

<u>Reagens</u>	<u>markierte Komponenten</u>	
	<u>Proteine</u>	<u>RNA</u>
		23S 5S
<u>Jodamphenicol</u>	L2, L13, L26, L27 (H) L6, L7/L12, L10, L11, L14, L17, L23, L28 (N) (L13, L26 variabel)	+ -
<u>N-Bromacetyl- puromycin</u>	L1, L2, L17, L23, L27 (H) L6, L7/L12, L10, L11, L22 (N) (L28 unsicher) (L1 variabel)	+ +

H = Hauptmarkierungsproteine

N = Nebenproteine

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der Affinitätsmarkierung von 50S Untereinheiten mit Jodamphenicol und N-Bromacetylpuromycin.

Cystein in ihrer Primärstruktur haben (vgl. Tabelle 10, Seite 87). Wie in Abschnitt 4.4.4. auf Seite 72 beschrieben, wird L13 nicht und L26/S20 nur sehr schwach vom Alkylierungsreagens Jodacetamid umgesetzt. Man hat es hier also mit einer ähnlichen Situation zu tun, wie sie auch schon für L1 und L23 bei der Umsetzung mit N-Bromacetylpuromycin diskutiert worden ist. L13 wird wie L1 nur vom Affinitätsanalogon nicht aber von Jodacetamid modifiziert, und L26/S20 wird wie L23 zwar von beiden markiert, aber der Markierungsgrad zwischen der Markierung vom Affinitätsanalog und der von Jodacetamid ist so groß, daß dieser Befund für eine besondere Affinität des Jodamphenicols zum Protein L26/S20 spricht.

In Tabelle 13 sind zusammenfassend alle Ergebnisse gezeigt, die mit Chloramphenicol und seinen Affinitätsanalogon erhalten wurden.

Gerade auch in Bezug auf die Ergebnisse, die mit N-Brom-acetylpuromycin gefunden wurden, sind die Resultate interessant, die Le Goffic und seine Mitarbeiter (1980) mit Chloramphenicol als Photomarker der A-site erhielten. Und zwar fanden sie mit threo-(³H)-Chloramphenicol L1 und L11 modifiziert. In einem

Reagens	markierte ribosomale	
	Komponenten	Referenz
Jodamphenicol	L2, L13, L26, L27, 23S RNA (H) L6, L7/L12, L10, L11, L14, L17, L23, L28 (N)	
Jodamphenicol	L16 (H) L6, L24 (N)	Pongs et al., 1973
Bromamphenicol	L2, L27 (H) L26 (N)	Sonenberg et al., 1973
Bromamphenicol	L2, L13, L27 (H) L9, L10, L14, L15, L17, L26, L28 (N)	Bald, unveröffent- licht
threo- CAM in Anwesenheit von erythro CAM	L1, L11 L11, L27	Le Goffic et al., 1980

CAM = Chloramphenicol

H = Hauptmarkierungsproteine

N = Nebenproteine

Tabelle 13: Ergebnisse der Affinitätsmarkierungen mit Jodamphenicol, Bromamphenicol und dem Photomarker Chloramphenicol.

Kontrollansatz wurde zusätzlich noch nicht radioaktives erythro-Chloramphenicol im Überschuß zugegeben, das keine antibiotische Wirkung hat und unspezifisch mit den Komponenten des Ribosoms reagiert. Hierbei wurden die Proteine L11 und L27 radioaktiv markiert. Das bedeutet, daß in diesem Versuch L1 von Chloramphenicol nicht aufgrund seiner Affinität zum Peptidyltransferasezentrum modifiziert worden ist. Interessant ist allerdings auch, daß L27 als Hauptprotein gefunden wurde. Denn dieses Protein wird von bisher untersuchten Photoaffinitätsreagenzien zur Lokalisierung des Peptidyltransferasezentrums, wenn überhaupt, dann nur schwach markiert.

Pongs et al. (1973) fanden hauptsächlich L16 mit Jodamphenicol markiert, daneben noch L6 und L24. Obwohl in dieser Arbeit das gleiche Reagens verwendet wurde, bestehen erhebliche Unterschiede in den Ergebnissen. Eine bessere Übereinstimmung ergibt sich mit den Ergebnissen von Sonenberg et al. (1973), die bei der Umsetzung mit Bromamphenicol neben L26/S20 die beiden Proteine L2 und L27 fanden. Sehr gut allerdings stimmen die hier erhaltenen Ergebnisse mit den unveröffentlichten von Bald überein (Tabelle 13), der die markierten Proteine, wie in dieser Arbeit, mit immunologischen Methoden untersuchte.

Zwei Proteine, nämlich L2 und L27, werden häufig mit Affinitätsmarkierungsreagenzien modifiziert, die über eine Haloacylgruppe mit den Komponenten des Ribosoms kovalent reagieren. Dabei scheint es keine Rolle zu spielen, ob es sich um ein Markierungsreagens der A-site oder um eines der P-site handelt. Denn A-site Reagenzien (Jodamphenicol und Bromamphenicol) reagieren mit diesen Proteinen genauso stark wie P-site Marker, z.B. N-Bromacetylpuromycin, oder auch die beiden Analogen der Peptidyl-tRNA N-Bromacetylphenylalanyl-tRNA (Oen et al., 1973) und N-Bromacetylmethionyl-tRNA (Sopori et al., 1974). Man sollte also bei der Beurteilung dieser Proteine äußerst vorsichtig sein, denn sie zählen zu den nukleophilsten Proteinen der 50S Untereinheit, und elektrophile Gruppen, wie z.B. der Bromacetylrest, reagieren leicht mit diesen Proteinen. Photo-

reaktive Peptidyl-tRNA-Derivate zeigen ein anderes Reaktionsmuster. Zum Beispiel modifiziert p-(2-nitro-4-azidophenoxy) phenylacetylphenylalanyl-tRNA (NAP-Phe-tRNA) hauptsächlich L18 und L11, das in dieser Arbeit nur schwach markiert gefunden werden konnte, daneben aber auch L1, L2, L5, L27 und L33 (Hsiung et al., 1974). L11 und L18 sind wiederum Proteine, die relativ häufig durch Photoaffinitätsanaloge markiert gefunden werden. Diese Proteine werden sowohl mit P-site-Markern, wie NAP-Phe-tRNA, als auch mit A-site-Markern, wie z.B. Chloramphenicol und p-Azidopuromycin, modifiziert gefunden. Es hat also den Anschein, daß eine ganze Reihe von Proteinen, sowohl bei der chemischen Affinitätsmarkierung als auch bei der Photoaffinitätsmarkierung, nur aufgrund ihrer Reaktivität von den eingesetzten Reagenzien markiert werden und nicht aufgrund ihrer Zugehörigkeit bzw. Nähe zum Peptidyltransferasezentrum. Dies zeigt, wie wichtig es ist, die Ergebnisse, die man durch die Affinitätsmarkierung erhalten hat, mit Ergebnissen von anderen Methoden zu vergleichen, die Aussagen über die Zusammensetzung oder die Lage des Peptidyltransferasezentrums machen können.

Vergleicht man die mit den beiden Affinitätsanalogenen markierten Komponenten mit denen, die zur Rekonstitution der Peptidyltransferaseaktivität notwendig sind, finden sich Übereinstimmungen bezüglich L2 und 23S RNA (Schulze und Nierhaus, 1982). L13, L17 und L27 gehören zu den Proteinen, die die Peptidyltransferaseaktivität stark stimulieren (Hampl et al., 1981) (vgl. auch Abschnitt 1.2.1., Seite 11).

Hier zeigt sich jetzt, daß dem Protein L2 wohl doch eine stärkere Rolle beizumessen ist, als aufgrund der hier durchgeführten Kontrollexperimente zur Affinitätsmarkierung zunächst angenommen wurde. Die Bedeutung, die L2 für die Aktivität des Peptidyltransferasezentrums hat, wird auch noch in einem anderen Experiment gezeigt. Durch Photooxidation des isolierten B.steartophilus Proteins BL3, das dem E. coli Protein L2 entspricht, konnten Auron und Mitarbeiter (1978) zeigen, daß durch Modifikation eines Histidins nach Rekonstitution der Partikel

die Peptidyltransferaseaktivität auf unter 20% der Normalaktivität absinkt. Eine ähnliche Untersuchung wurde von Baxter und Zahid (1978) mit dem E. coli Protein L16 durchgeführt, das sowohl nach Affinitätsmarkierungsexperimenten von verschiedenen Arbeitsgruppen als auch nach den Rekonstitutionsexperimenten von Hampl et al. (1981) für die Aktivität der Peptidyltransferase notwendig ist. Sie modifizierten das einzige Histidin in L16 mit dem relativ spezifischen Äthoxyameisensäureanhydrid. Nach Rekonstitution der 50S Untereinheiten waren diese praktisch völlig inaktiv. Zwar konnte L16 bei der Affinitätsmarkierung mit N-Bromacetylpuromycin und Jodamphenicol nicht gefunden werden, aber Vernetzungsversuche mit 2-Iminothiolan zeigen die unmittelbare Nachbarschaft von L16 zu L23 und L27 (Traut et al., 1979).

In der Abbildung 21 soll veranschaulicht werden, wie die Hauptmarkierungsproteine nach den Ergebnissen der Quervernetzung (Traut et al., 1979) miteinander in Beziehung stehen. Die meisten Verbindungen wurden mit 2-Iminothiolan hergestellt. Bei eigenen Quervernetzungsversuchen mit Dimethylsuberimidat

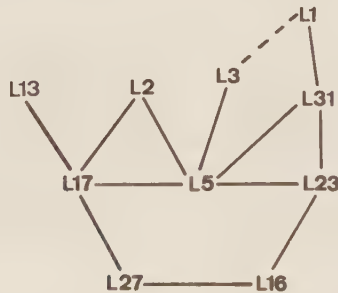


Abbildung 21: Quervernetzung der bei den Affinitätsmarkierungen stark modifizierten Proteine mit 2-Iminothiolan (Traut et al., 1979). Die gestrichelte Linie zwischen L1 und L3 zeigt eine Verknüpfung dieser Proteine mit Dimethylsuberimidat.

wurden Hinweise für eine Verknüpfung zwischen L1 und L3 gefunden, was in dieser Abbildung durch die gestrichelte Linie dargestellt ist.

Die Proteine L2 und L17, L17 und L27 sowie L13 und L17 sind direkte Nachbarn, während die anderen Hauptmarkierungsproteine über ein drittes Protein miteinander verbunden sind; so z.B. L1-L31-L23 oder L2-L5-L23. Das bedeutet, daß die in dieser Arbeit gefundenen stark markierten Proteine in einem begrenzten Areal liegen müssen.

Nach all diesen Vergleichen der mit N-Bromacetylpuromycin und Jodamphenicol markierten Proteine mit anderen Affinitätsmarkierungen und anderen Methoden zur Lokalisierung der Peptidyltransferase, lassen sich sehr viele Übereinstimmungen finden. So wird L23 sehr häufig von verschiedenen Affinitätsmarkern auch von Photomarkern umgesetzt, während L2 und L27 meist nur mit Haloacylderivaten reagieren. Rekonstitutionsexperimente zeigen, daß L2 und die 23S RNA für die Aktivität notwendig sind, während L13, L17 und L23 stark stimulierende Komponenten sind. Auch Modifikationen einzelner Proteine zeigen die Bedeutung von L2 und wegen ihrer direkten Nachbarschaft zu L16 von L23 und L27 (Quervernetzungsexperimente). Protein L1 bekommt durch die elektronenmikroskopische Lokalisierung der Puromycinbindestelle ein starkes Gewicht. Lediglich für L26/S20, das durch Jodamphenicol stark markiert wurde, können keine weiteren Hinweise gefunden werden, die eine Zugehörigkeit oder Nähe zum Peptidyltransferasezentrum wahrscheinlich machen. Man weiß lediglich, daß dieses Protein an der Grenzfläche zwischen der 30S- und der 50S Untereinheit liegen muß. Ob es aber in der Nähe der elektronenmikroskopisch lokalisierten Puromycinbindestelle liegt oder weit ab, ist nicht bekannt.

In der Abbildung 22 sind, soweit bisher bekannt, alle ribosomalen Komponenten eingezeichnet, die von den beiden Affinitätsanalogen markiert wurden. Die elektronenmikroskopisch lokalisierten Bindestellen der Antibiotika Puromycin und Chloramphenicol, die Proteine L1 und L27 sowie das 3'-Ende der 5SRNA befinden sich

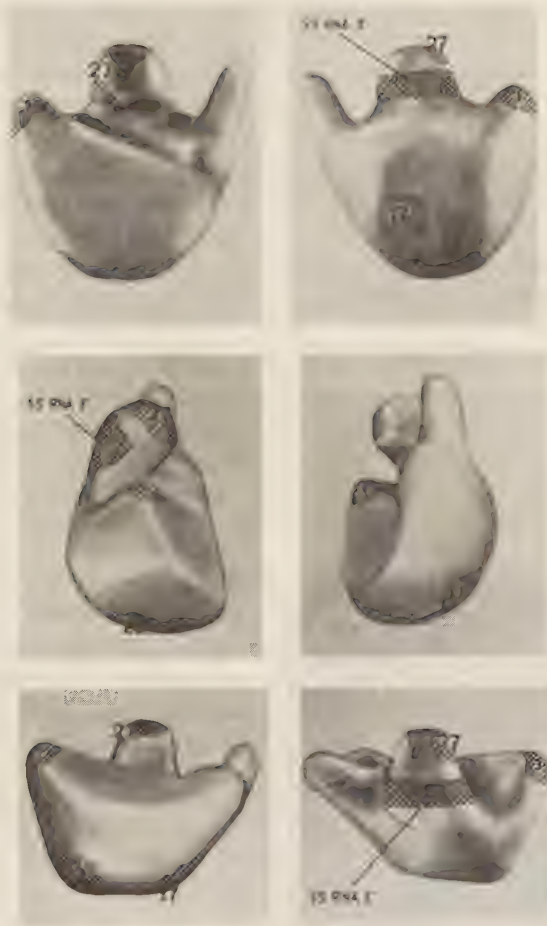


Abbildung 22: Modell der 50S Untereinheit von *E. coli* mit den Lokalisationen der ribosomalen Komponenten, die von den beiden Affinitätsanalogen markiert wurden.

4.6. Affinitätsmarkierungsexperimente mit Bacillus stearothermophilus 50S Untereinheiten zur Identifizierung der Puromycin- bzw. Chloramphenicol-Bindungsproteine

4.6.1. Umsetzung von B.stearothermophilus 50S Untereinheiten mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin bzw. (^{14}C)-Jodamphenicol

Die 50S Untereinheiten von B.stearothermophilus wurden je dreimal, wie in Abschnitt 3.3.1. beschrieben, mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin und (^{14}C)-Jodamphenicol umgesetzt.

Reagens	Anzahl der Umsetzungen	Einbau je Mol	Radioaktivitätsverteilung in %	
			Protein	RNA
BAP	3	0,25 - 0,5	60 - 80	20 - 40
JAM	3	0,5 - 0,6	80 - 90	10 - 20

BAP = N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin
 JAM = (^{14}C)-Jodamphenicol

Tabelle 14: Affinitätsmarkierung von B. stearothermophilus 50S Untereinheiten mit N-Bromacetylpuromycin und Jodamphenicol.

Die Einbaurrate lag bei den Umsetzungen mit dem Puromycinanalogon zwischen 0,25 und 0,5 und mit Jodamphenicol zwischen 0,2 und 0,6 Mol pro Mol Untereinheit (Tabelle 14) und war mit dem Einbau bei den Umsetzungen in die E. coli 50S Untereinheiten vergleichbar. Etwas anders sah es mit der Verteilung der Radioaktivität zwischen der Protein- und der RNA-Fraktion aus. Während diese beim Jodamphenicol noch ähnlich war wie bei den umgesetzten 50S Untereinheiten von E. coli, nämlich 80 bis 90% der Radioaktivität im Protein und 10 bis 20% in der RNA, verschob sich das Verhältnis beim N-Bromacetylpuromycin in Richtung RNA. So wurden bei den 50S Untereinheiten von B.stearothermophilus 60 bis 80% der Radioaktivität in die Proteine

und 20 bis 40% in die RNA eingebaut, das heißt, daß im Vergleich mit *E. coli* ungefähr doppelt so viel N-Bromacetylpuromycin mit der RNA reagiert hatte.

4.6.2. Bindung von N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin bzw. (^{14}C)-Jodamphenicol an die ribosomale RNA der 50S Untereinheit von *B. stearothermophilus*

Wie bei den *E. coli* 50S Untereinheiten wurde auch die essig-säuregefällte RNA der großen Untereinheiten von *B. stearothermophilus* in Lösung gebracht und auf einem 5% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Autoradiographien der RNAs sowohl der N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin als auch der (^{14}C)-Jodamphenicol umgesetzten 50S Untereinheiten zeigten, daß beide, die 23S und die 5S RNA, radioaktiv markiert waren.

4.6.3. Identifizierung der affinitätsmarkierten Proteine der 50S Untereinheit von *B. stearothermophilus*

Die Identifizierung der affinitätsmarkierten Proteine wurde mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann durchgeführt. Die Nomenklatur der einzelnen Proteine nach Fahnestock et al. (1981) ist in Abbildung 24 gezeigt. Zusätzlich wurden Autoradiographien von Celluloseacetatgelen angefertigt. Antiseren gegen *B. stearothermophilus* Proteine standen nur gegen die Proteine BL2, BL3 und BL10 zur Verfügung. Auf die Bedeutung der immunologischen Identifizierung der markierten Proteine wurde bereits in Kapitel 4.4.1.3. auf Seite 60 hingewiesen. Aufgrund der fehlenden Antiseren muß daher die Charakterisierung der markierten Komponenten weniger eindeutig bleiben als bei *E. coli*. Die Zuordnung der gefundenen markierten Proteine zu ihren *E. coli* Homologen erfolgte aufgrund der Korrelation von Auron und Fahnestock (1981), aus den

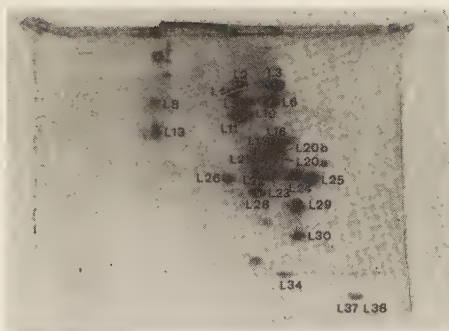


Abbildung 24: Zweidimensionales Polyacrylamidgelelektrophogramm vom Gesamtprotein der 50S Untereinheit von *B. stearothermophilus* mit der Nomenklatur der einzelnen Proteine nach Fahnestock et al., 1981.

Primärstrukturen einiger Proteine (Kimura, persönliche Mitteilung) und für BL3 und BL10 durch Antiseren.

4.6.4. Identifizierung der N-Brom-(^{14}C)-acetyluromycin affinitätsmarkierten Proteine

In Abbildung 25 ist ein zweidimensionales Polyacrylamidgelelektrophogramm nach Kaltschmidt und Wittmann gezeigt. Fast die ganze Radioaktivität in der zweiten Dimension liegt in dem Fleck a, der nicht sicher einem einzigen Protein zugeordnet werden kann, da hier auf dem Elektrophogramm die beiden Proteine BL22 und BL23 liegen, die den *E. coli* Proteinen EL18 bzw. EL22 entsprechen. Neben diesem Hauptmarkierungsprotein findet man in geringem Maße Radioaktivität in den Flecken BL2 (EL1),

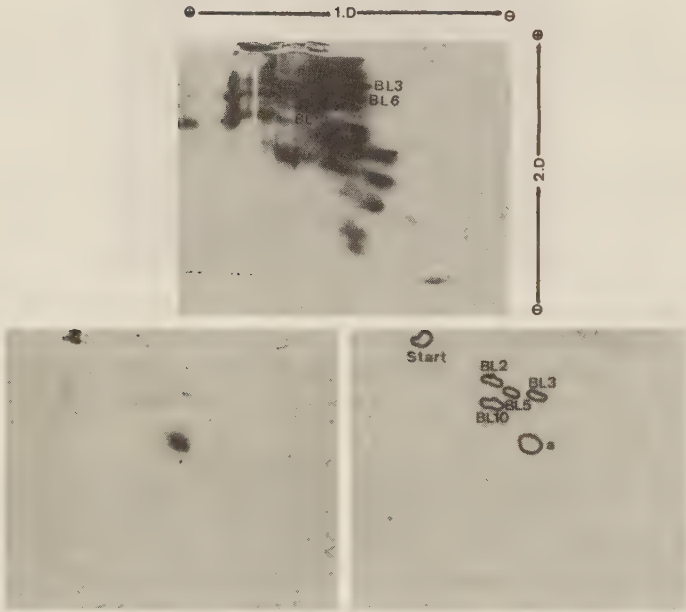


Abbildung 25: Zweidimensionales Polyacrylamidgelelektropherogramm nach der Methode von Kaltschmidt und Wittmann im Mikromaßstab (oben) mit dem dazugehörigen Autoradiogramm (unten links) sowie einer schematischen Darstellung der radioaktiven Schwärzungen (unten rechts). Aufgetrennt wurden die Proteine der mit N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin umgesetzten 50S Untereinheit von *B. stearothermophilus*. (Die Schwärzung von Protein BL6 ist auf diesem Autoradiogramm nicht sichtbar.)

BL3 (EL2), BL5 (EL5), BL6 (EL3) und BL10 (EL6).

Nach Auftrennung der Proteine in der Celluloseacetatgelelektrophorese findet man im Autoradiogramm drei stark geschwärzte Banden (1,3,6 in Abbildung 26) und sechs schwächere. Am Start blieb nur eine geringe Menge an radioaktivem Material zurück. Es zeigt sich also, daß bei einer zweidimensionalen Gelelektrophorese einige Proteine selektiv liegen blieben und nicht in das Gel gewandert sind. Nur einige wenige Proteine in den Banden, die im Elektropherogramm der Celluloseacetatgelelektrophorese zu sehen waren, konnten ihren homologen Proteinen zugeordnet werden (BL2 in Bande 3 = EL1, BL3 in Bande 10 = EL2). Die Markierung dieser Proteine wurde auch immunologisch nachgewiesen.

Aufgrund vorläufiger Zuordnungen kann über die Natur der anderen Banden nur eine vorläufige Aussage gemacht werden. Bande 1 entspricht nicht dem *E. coli* Protein L7/L12 sondern einem sauren Protein, das nicht nummeriert wurde. Bande 2 könnte dem *E. coli* Protein L9 entsprechen oder einem nicht ribosomalen Protein. Bande 5 konnte im Zusammenhang mit immunologischen Ergebnissen mit hoher Wahrscheinlichkeit als Protein BL10 (EL6)

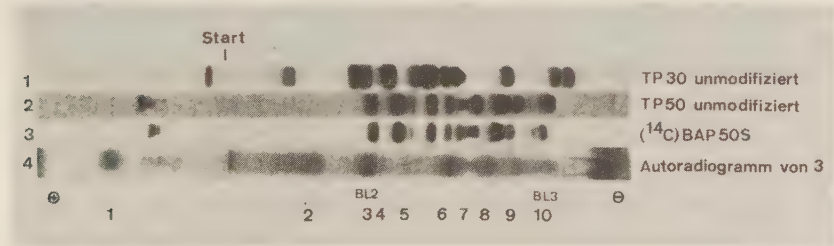


Abbildung 26: Celluloseacetatgelelektropherogramm der ribosomalen Proteine von *B. stearothermophilus*. Spur 1: Proteine der 30S Untereinheit; Spur 2: Proteine der 50S Untereinheit; Spur 3: Proteine von N-Brom-(¹⁴C)-acetylpuromycin umgesetzten 50S Untereinheiten; Spur 4: Autoradiogramm der Spur 3.

identifiziert werden. Unter der Annahme, daß Bande 6 dem Fleck a in der zweidimensionalen Gelelektrophorese entspricht, sollte dieses Protein das Homologe von Protein L18 sein. Für den Fall, daß Bande 8 dem Fleck a zuzuordnen ist, ist eine Unterscheidung zwischen BL22 und BL23 also EL18 und EL22 nicht möglich. Die mit der Front wandernde Radioaktivität könnte vielleicht dem *E. coli* Protein L34 zugeordnet werden. Sie beruht aber wahrscheinlich auf einem Gemisch durch Degradation entstandener basischer Proteine. Zusammenfassend kann nur gesagt werden, daß die Proteine BL2 (EL1) und BL22(EL18) oder BL23 (EL22) stark und BL3 (EL2) schwach markiert wurden.

4.6.5. Identifizierung der (¹⁴C)-Jodamphenicol affinitätsmarkierten Proteine

Bei der Analyse der mit Jodamphenicol umgesetzten 50S Untereinheiten von *B. stearothermophilus* fällt wiederum sofort auf, daß die meiste Radioaktivität am Start liegenblieb. In allen zweidimensionalen Gelelektropherogrammen kommt am stärksten BL28 zum Vorschein, das dem *E. coli* Protein L23 entspricht (Abbildung 27). Schwach aber eindeutig markiert waren die Proteine BL2 (EL1), BL5 (EL5), BL6 (EL3), BL37 und BL38 (Homologien zu *E. coli* Proteinen unbekannt). Nicht eindeutig einem Protein zuzuordnen waren der Fleck a, der wahrscheinlich dem Protein BL10 (EL6) entspricht, Fleck b, wahrscheinlich BL20b (EL16) sowie der Fleck c, der entweder BL22 (EL18) oder BL23 (EL22) entspricht. Zwei Proteine, BL3 (EL2) und BL30 (EL27) sind auf den Autoradiographien der meisten Polyacrylamidgelelektropherogramme sichtbar, nicht aber auf dem hier abgebildeten.

Das Autoradiogramm des Celluloseacetatgelelektropherogramms (Abbildung 28B) zeigt, daß wiederum mehr Proteine markiert wurden, als man dies aus dem Autoradiogramm des zweidimensionalen Gelelektropherogramms annehmen würde. Neben zwei stark geschwärzten Banden (3 und 7) sieht man acht schwächer markierte. Von den beiden stark radioaktiven Banden läßt sich Bande 3 dem Protein BL2 (EL1) zuordnen (vgl. Abschnitt 4.6.4., Seite 113).

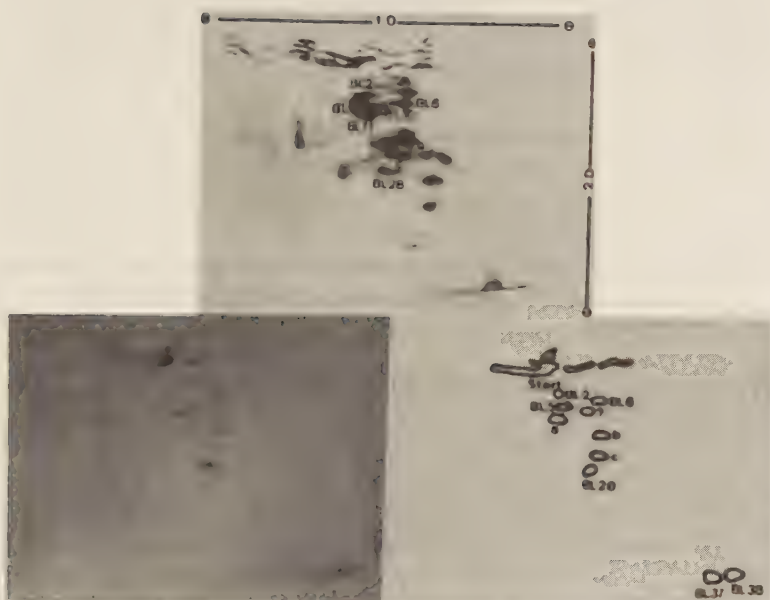


Abbildung 27: Zweidimensionales Polyacrylamidgelelektropherogramm nach der Methode von Kaltschmidt und Wittmann im Mikromaßstab (oben) mit dem dazugehörigen Autoradiogramm (unten links) sowie einer schematischen Darstellung der radioaktiven Schwärzungen (unten rechts). Aufgetrennt wurden die Proteine der mit (^{14}C)-Jodamphenicol umgesetzten 50S Untereinheit von *B. stearothermophilus*.

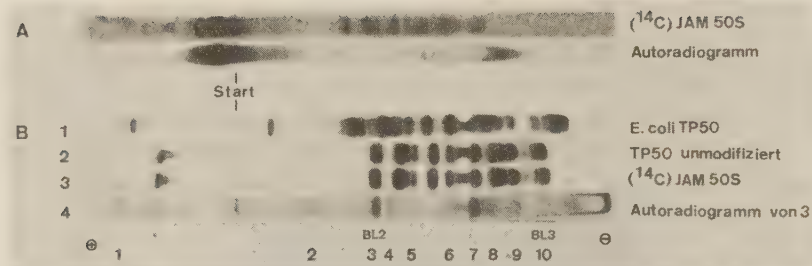


Abbildung 28: Celluloseacetatgelelektropherogramm A. von Proteinen nicht Salz gewaschener SOS Untereinheiten mit dem Autoradiogramm (Kurzlauf) B. von Proteinen der Salz gewaschenen SOS Untereinheiten von *E. coli* (Spur 1) und von *B. stearothermophilus* (Spur 2), sowie der Proteine von (^{14}C) -Jodamphenicol umgesetzten SOS Untereinheiten (Spur 3) mit dem dazugehörigen Autoradiogramm (Spur 4).

Die Bande 7 wird nur durch Jodamphenicol, nicht aber durch das Puromycinanalogue markiert. Diese Bande könnte dem Protein BL28 (EL23) der zweidimensionalen Gelelektrophorese entsprechen, was allerdings nicht eindeutig zu klären war.

Zur Natur der weniger stark markierten Banden kann eindeutig gesagt werden, daß Bande 5 dem Protein BL10 (EL6) und Bande 10 dem Protein BL3 (EL2) entspricht. Diese Ergebnisse wurden aufgrund immunologischer Untersuchungen erhalten. Eine Zuordnung der anderen Banden kann ohne weitere immunologische Untersuchungen nicht vorgenommen werden. Über eventuelle Homologien wurde bereits in Kapitel 4.6.4. diskutiert.

Die beschriebenen Versuche wurden mit SOS Untereinheiten von *B. stearothermophilus* durchgeführt, die durch Salzwäsche gereinigt waren, wie es in Abschnitt 3.2.1. beschrieben ist. Führt man eine Affinitätsmarkierung an Ribosomen durch, die nicht einer solchen Salzbehandlung unterzogen wurden, findet man ein völlig anderes Markierungsmuster. Das in Abbildung 28A gezeigte Autoradiogramm läßt deutlich erkennen, daß die meisten markierten Proteine nicht ribosomalen Ursprungs sind. Dieses Ergebnis

zeigt deutlich, daß Affinitätsmarkierungen mit Haloacylreagenzien zur Alkylierung vieler Proteine führen. Mit anderen Worten heißt das, daß man bei Verwendung solcher Reagenzien streng zwischen alkylierten und affinitätsmarkierten Proteinen unterscheiden muß, und es unbedingt notwendig ist, Kontrollen durchzuführen, wie es z.B. in dieser Arbeit bei der Affinitätsmarkierung von *E. coli* 50S Untereinheiten mit N-Bromacetylpuromycin geschehen ist. Außerdem sollte man Ergebnisse, die durch andere Methoden erhalten wurden, sofern es möglich ist, in die Beurteilung der Affinitätsmarkierung einbeziehen.

4.6.6. Diskussion der Ergebnisse der Affinitätsmarkierung von *B. stearothermophilus* 50S Untereinheiten mit N-Brom-acetylpuromycin und Jodamphenicol

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse für die Reaktion der *B. stearothermophilus* 50S Untereinheiten mit den beiden Affinitätsmarkierungsreagenzien dargestellt. Beide Antibiotika reagieren mit dem Protein BL2 sehr stark, obwohl dieses Protein in seiner Primärstruktur kein Cystein hat (Kimura, persönliche Mitteilung). Es wird also das Homologe des *E. coli* Proteins L1 markiert, das auch bei der Affinitätsmarkierung von *E. coli* 50S Untereinheiten durch N-Bromacetylpuromycin stark modifiziert gefunden wurde. BL3 (EL2) wird von beiden Affinitätsanalogen schwach markiert, obwohl es nach den Modifikationsexperimenten von Auron et al. (1978) für die Aktivität der Peptidyltransferase unbedingt erforderlich ist (vgl. Abschnitt 4.5.3., Seite 106). In BL30 (EL27) konnte nur bei der Umsetzung mit Jodamphenicol eine geringe Markierung gefunden werden. Diese beiden Proteine, die bei *E. coli* durch jedes Affinitätsmarkierungsreagens, das über eine Haloacylgruppe mit den Komponenten des Ribosoms reagiert, stark markiert werden, lassen sich in *B. stearothermophilus* 50S Untereinheiten schlecht modifizieren. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich darin zu sehen, daß diese Proteine,

N-Bromacetylpuromycin

Jodamphenicol

		Entsprechendes		
<u>E. coli</u>	<u>B. stearo.</u>	<u>E. coli Protein</u>	<u>B. stearo.</u>	<u>E. coli</u>
23S RNA	23S RNA		23S RNA	23S RNA
5S RNA	5S RNA		5S RNA	
L1(H)	BL2 (H)	L1	BL2 (H)	
L2(H)	BL3	L2	BL3	L2(H)
	BL6	L3	BL6	
	BL5	L5	BL5	
L6	BL10	L6	BL10	L6
L7/L12				L7/L12
L10				L10
L11				L11
				L13(H)
L14				L14
		L16	BL20b?	
L17(H)				L17
	BL22?	L18	BL22?	
L22	BL23?	L22	BL23?	
L23(H)		L23	BL28(H)	L23
				L26(H)
L27(H)		L27	BL30	L27(H)
				L28
		+	BL37/BL38	

H = Hauptmarkierungsprotein

+ = Homologie zu einem E. coli Protein nicht bekannt

? = Zuordnung der Radioaktivität zu diesem Protein nicht eindeutig

Tabelle 15: Ergebnisse der Affinitätsmarkierung von *B. stea-*
arothermophilus 50S Untereinheiten mit N-Brom-(¹⁴C)-acetyl-
puromycin und (¹⁴C)-Jodamphenicol im Vergleich mit den
entsprechenden Ergebnissen der Affinitätsmarkierung von
E. coli 50S Untereinheiten.

wie es zumindest für BL30 gezeigt werden konnte (Kimura, persönliche Mitteilung), kein Cystein in ihrer Primärstruktur haben. Das Homologe des Proteins BL28, das ein Hauptmarkierungsprotein bei der Umsetzung mit Jodamphenicol ist, konnte bei der Affinitätsmarkierung von *E. coli* 50S Untereinheiten mit N-Bromacetylpuromycin sowie von anderen Arbeitsgruppen bei Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten ebenfalls stark markiert gefunden werden.

1976 veröffentlichten Wischnath et al. ihre Ergebnisse von den Affinitätsmarkierungen an Ribosomen von *B. stearothermophilus* mit Jodamphenicol und N-Jodacetylpuromycin. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit könnten sie mit Jodamphenicol nur einige wenige Proteine äußerst schwach markiert finden. Für das Puromycinanaloge geben sie BL28 (EL23) als das am stärksten modifizierte Protein an, das in dieser Arbeit allerdings als Hauptmarkierungsprotein bei der Umsetzung mit Jodamphenicol gefunden werden konnte. BL2 (EL1) reagiert bei ihren Experimenten mit keinem der beiden Antibiotika.

Von den stark markierten Proteinen BL2, BL22/23 und BL28 findet man die homologen *E. coli* Proteine EL1 und EL18 in dem Bereich des Ribosoms, der von verschiedenen Autoren als der Ort des Peptidyltransferasezentrums identifiziert worden ist.

Obwohl die markierten Proteine von *B. stearothermophilus* nicht mit der Sicherheit identifiziert werden konnten wie die von *E. coli*, zeigt sich doch, daß die beiden Affinitätsmarkierungsreagenzien N-Bromacetylpuromycin und Jodamphenicol bei *B. stearothermophilus* in vergleichbarer Weise mit den Komponenten des Ribosoms reagieren wie bei *E. coli* und auch hier zur Untersuchung des Peptidyltransferasezentrums geeignet sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Affinitätsmarkierungsexperimente zur Identifizierung der am Aufbau des Peptidyltransferase-zentrums beteiligten Komponenten an Ribosomen von *E. coli* vorgenommen. N-Brom-(^{14}C)-acetylpuromycin wurde als P-site Reagens verwendet, während zur spezifischen Markierung der ribosomalen A-site (^{14}C)-Jodamphenicol verwendet wurde.

Zunächst war es notwendig, Methoden zu finden, die eine zuverlässige Identifizierung der markierten Komponenten ermöglicht. So wurde die Markierung der ribosomalen RNA mittels Autoradiographie von RNA-Polyacrylamidgelen untersucht, während die Proteine mittels Autoradiographien von 1) zweidimensionalen Polyacrylamidgelen, 2) von Immunodiffusogrammen und 3) von eindimensionalen Celluloseacetatgelen identifiziert wurden.

Das Puromycinanaloge markierte sowohl die 23S und 5S RNA als auch die Proteine L1, L2, L17, L23 und L27, während Jodamphenicol mit der 23S RNA und den Proteinen L2, L13, L26 und L27 reagierte. Beide Affinitätsanaloge markierten neben diesen vielen Hauptproteinen noch eine ganze Reihe anderer Proteine schwach. Dieses Problem der Markierung multipler Komponenten wurde auch von anderen Autoren bei der Affinitätsmarkierung des Peptidyltransferasezentrums mit anderen Reagenzien beobachtet. Es wurden deshalb Kontrollversuche erarbeitet, die es ermöglichten, zwischen affinitätsmarkierten und unspezifisch alkylierten Proteinen zu unterscheiden. In einem dieser Kontrollexperimente wurden die 50S Untereinheiten von *E. coli* mit (^{14}C)-Jodacetamid umgesetzt. Dieses Reagens ist wie die Antibiotikaderivate ein Haloacylreagens, das vornehmlich mit Sulfhydrylgruppen reagiert, aber keine Affinität zum Peptidyltransferasezentrum besitzt. In einem weiteren Kontrollexperiment wurde das isolierte Gesamtprotein aus 50S Untereinheiten mit dem Affinitätsanalogon von Puromycin umgesetzt. Als Ergebnis zeigte sich hier, daß alle Proteine, die mindestens ein Cystein in ihrer Primärstruktur haben, markiert werden. Durch Kombination

der Ergebnisse der Affinitätsmarkierung mit denen der Kontroll-experimente konnte geschlossen werden, daß Protein L1, welches nur innerhalb des Ribosoms und nur mit N-Brom-acetylpuromycin reagierte, und Protein L23, das ebenfalls nur innerhalb des Ribosoms und nur in einem ganz geringen Maße mit Jodacetamid reagierte, aufgrund ihrer Zugehörigkeit oder Nähe zum Peptidyltransferasezentrum modifiziert wurden. Im Falle von Jod-amphenicol sind dies die beiden Proteine L13 und L26/S20.

Die von uns erhaltenen Ergebnisse zeigten beim Vergleich mit anderen in der Literatur beschriebenen Affinitätsmarkierungen aber auch mit Rekonstitutions-, Quervernetzungs- und Modifikationsexperimenten generell eine auffallend gute Übereinstimmung. Protein L2 ist aufgrund dieser Ergebnisse mit großer Wahrscheinlichkeit ein Bestandteil des Peptidyltransferasezentrums. Die starke Markierung dieses Proteins durch die beiden Haloacylanaloga von Puromycin und Chloramphenicol könnte deshalb, trotz des Cysteingehalts dieses Proteins, als spezifisch anzusehen sein.

Besonders gut stimmen die vorliegenden Ergebnisse aber auch mit der immunelektronenmikroskopischen Lokalisierung dieses funktionellen Zentrums zwischen der zentralen und der großen lateralen Protuberenz der 50S Untereinheit überein. Diese Region liegt im 70S Ribosom an der Grenzfläche zwischen den beiden Untereinheiten.

Bei Untersuchungen von 70S Ribosomen und 30S Untereinheiten wurden allerdings keine Hinweise dafür gefunden, daß Proteine der 30S Untereinheit am Aufbau des Peptidyltransferasezentrums beteiligt sind, wenn man davon absieht, daß Protein L26 mit Protein S20 identisch ist.

Affinitätsmarkierungen mit den gleichen Reagenzien wurden auch an Ribosomen aus *B. stearothermophilus* durchgeführt. Beide Affinitätsanaloga markierten wiederum die 5S und 23S RNA und sicher die Proteine BL2=EL1 (stark) und BL3=EL2 (schwach). Die Markierung dieser Proteine konnte mit jeder der 3 Methoden nachgewiesen werden. Durch das Puromycinanalog wurde zusätzlich

entweder BL22=EL18 oder BL23=EL22, durch das Chloramphenicol-analog hingegen BL28=EL23 eindeutig markiert. Die Identifizierung dieser und weiterer Proteine beruht nur auf den Ergebnissen der Autoradiographien von zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektropherogrammen und Celluloseacetatelektropherogrammen. Diese beiden Methoden reichen aber, wie bei den Versuchen mit *E. coli* Ribosomen gezeigt werden konnte, zur eindeutigen Proteinidentifizierung nicht aus. Deshalb können die letzteren Ergebnisse nur mit Vorbehalten bewertet werden, zumal die Zuordnung einzelner ribosomaler Proteine aus *B. stearothermophilus* zu den Banden in der eindimensionalen Celluloseacetatgelelektrophorese bisher unvollständig blieb. Aus den Ergebnissen kann jedoch geschlossen werden, daß homologe Komponenten beider Bakterienspezies am Aufbau des Peptidyltransferasezentrums beteiligt sind. Eine Lokalisation des Peptidyltransferasezentrums mittels Immunelektronenmikroskopie an Ribosomen verschiedener Organismen ist daher in Analogie zu den bei *E. coli* durchgeführten Experimenten durchaus möglich.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Auron, P.E.; Erdelsky, K.J. und Fahnestock, S.R.: Chemical Modification Studies at the Peptidyltransferase Site of the *Bacillus stearothermophilus* Ribosome.
J. Biol. Chem. 253, 6893-6900 (1978)
- Auron, P.E. und Fahnestock, S.R.: Functional Organization of the Large Ribosomal Subunit of *Bacillus stearothermophilus*.
J. Biol. Chem. 256, 10105-10110 (1981)
- Avery, O.T.; MacLeod, C.M.; McCarthy, M.: Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from *Pneumococcus* Type III.
J. exp. Med. 79, 137-157 (1944)
- Bald, R.; Erdmann, V.A. und Pongs, O.: Irreversible Binding of Chloramphenicol Analogues to *E. coli* Ribosomes.
FEBS-Lett. 28, 149-152 (1972)
- Baxter, R.M. und Zahid, N.D.: The Modification of the Peptidyl Transferase Activity of 50S Ribosomal Subunits, LiCl-Split Proteins and L16 Ribosomal Protein by Ethoxy formic acid.
Eur. J. Biochem. 91, 49- 56 (1978)
- Brauer, D. und Üchsner, J.: The Primary Structure of Protein L1 from the Large Ribosomal Subunit of *Escherichia coli*.
FEBS-Lett. 96, 317-321 (1978)
- Brimacombe, R.; Nierhaus, K.H.; Garrett, R.A. und Wittmann, H.G.: The Ribosome of *Escherichia coli*.
in: Prog. Nucl. Acid Res. Molec. Biol. (ed. Cohn, W. E.) 18, 48-90 (1976)
- Brimacombe, R.; Stöffler, G. und Wittmann, H.G.: Ribosome Structure.
Ann. Rev. Biochemistry 47, 217-250 (1978)
- Brosius, J.; Dall, T.J. und Noller, H.F.: Complete Nucleotide Sequence of a 23S Ribosomal RNA Gene from *Escherichia coli*.

- Proc. Nat. Acad. Sci. 77, 201-204 (1980)
- Brosius, J.; Palmer, M.L.; Kennedy, P.J. und Noller, H.F.:
Complete Nucleotide Sequence of a 16S Ribosomal RNA Gene
from *Escherichia coli*.
Proc. Nat. Acad. Sci. 75, 4801-4805 (1978)
- Brownlee, G.G.; Sanger, F. und Barrel, B.G.: The Sequence of
5S Ribonucleic Acid.
J. Mol. Biol. 34, 379-412 (1968)
- Burton, C.J. und Hartley, B.S.: Chemical Studies on Methionyl-
tRNA Synthetase from *Escherichia coli*.
J. Mol. Biol. 52, 165-178 (1970)
- Carbon, P.; Ehresmann, C.; Ehresmann, B. und Ebel, J.P.: The
Sequence of *Escherichia coli* Ribosomal 16S RNA Determined
by New Rapid Gel Methods.
FEBS-Lett. 94, 152-156 (1978)
- Chen, R.; Mende, L. und Arfsten, U.: The Primary Structure of
Protein L27 from the Peptidyl-tRNA Binding Site of *Esche-
richia coli* Ribosomes.
FEBS-Lett. 59, 96-99 (1975)
- Collatz, E.E.; Küchler, E.; Stöffler, G. und Czernilofsky, A.P.:
The Site of Reaction on Ribosomal Protein L27 with an
Affinity Label Derivative of tRNA_f^{Met}.
FEBS-Lett. 63, 283-286 (1976)
- Cooperman, B.S.: Functional Sites on the *E. coli* Ribosome as
Defined by Affinity Labeling.
in Ribosomes-Structure, Function and Genetics (ed. Cham-
bliss, G.; Craven, G.R.; Davies, J.; Davis, K.; Kahan, L.;
Nomura, M.) University Park Press, Baltimore, 531-554 (1979)
- Cooperman, B.S.; Jaynes, E.N.; Brunswick, D.J. und Luddy, M.A.:
Photoincorporation of Puromycin and N-(ethyl-2-diazomalo-
nyl)puromycin into *Escherichia coli* Ribosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 2974-2978 (1975)
- Cundliffe, E.: Antibiotics and Prokaryotic Ribosomes: Action,
Interaction and Resistance.
in Ribosomes- Structure, Function and Genetics (ed. Cham-
bliss, G.; Craven, G.R.; Davies, J.; Davis, K.; Kahan, L.;
Nomura, M.) University Park Press, Baltimore, 555-581 (1979)

- Dabbs, E.R.; Ehrlich, R.; Hasenbank, R., Schroeter, B.H.; Stöffler-Meilicke, M. und Stöffler, G.: Mutants of *Escherichia coli* Lacking Ribosomal Protein L1.
J. Mol. Biol. 149, 553-578 (1981)
- Dietrich, S.; Schrandt, J. und Nierhaus, K.H.: Interdependence of *E. coli* Ribosomal Proteins at the Peptidyltransferase Centre.
FEBS-Lett. 47, 136-139 (1974)
- Dohme, F. und Nierhaus, K.H.: Role of 5S RNA in Assembly and Function of the 50S Subunit from *Escherichia coli*.
Proc. Nat. Acad. Sci. 73, 2221-2225 (1976)
- Eickenberry, E.; Bickle, F.; Traut, R. und Price, C.: Separation of Large Quantities of Ribosomal Subunits by Zonal-Ultrazentrifugation
Eur. J. Biochem. 12, 113-116 (1970)
- Erdmann, V.A.: Structure and Function of the 5S RNA and 5,8S RNA.
Progress in Nucleic Acid Res. 18, 45-90 (1976)
- Erdmann, V.A.; Fahnestock, S.R.; Higo, K. und Nomura, M.: Role of 5S RNA in the Functions of 50S Ribosomal Subunits.
Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 2932-2936 (1971)
- Expert-Besancon, A.; Guerin, M.F.; Hays, D.H.; Legault, L. und Thibault, J.: Preparation of *Escherichia coli* Ribosomal Subunits without Loss of Biological Activity.
Biochemie 56, 77-89 (1974)
- Fahnestock, S.R.; Strycharz, W.A. und Marquis, D.M.: Immunological Evidence of Homologies Among 50S Ribosomal Proteins of *Bacillus stearothermophilus* and *Escherichia coli*.
J. Biol. Chem. 256, 10111-10116 (1981)
- Franklin, T.J. und Snow, G.A.: Biochemie antimikrobieller Wirkstoffe.
Heidelberger Taschenbücher, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Seite 101 (1973)
- Geyl, D.; Böck, A. und Isono, K.: An Improved Method for Two-Dimensional Gel-Electrophoresis: Analysis of Mutationally Altered Ribosomal Proteins of *Escherichia coli*.
Mol. Gen. Genet. 181, 309-312 (1981)

- Glitz, C.; Zwieb, C.; Brimacombe, R.; Edwards, K. und Kössel, H.:
Secondary Structure of the Large Subunit Ribosomal RNA
from *Escherichia coli*, *Zea Mays* Chloroplast and Human
and Mouse Mitochondrial Ribosomes.
Nucleic Acids Research 9 (1981)
- Greenwell, P.; Harris, R.J. und Symons, R.H.: Affinity Labeling
of 23S RNA in the Active Centre of *Escherichia coli* Pepti-
dyltransferase.
Eur. J. Biochem. 49, 539-554 (1974)
- Hamel, E. und Nakamoto, T.: Studies on the Role of an *Escheri-*
chia coli 50S Ribosomal Component in Polypeptide Chain
Elongation.
J. Biol. Chem. 247, 6810-6817 (1972)
- Hampel, H.; Schulze, H. und Nierhaus, K.H.: Ribosomal Components
from *Escherichia coli* 50S Subunits Involved in the Re-
constitution of Peptidyltransferase Activity.
J. Biol. Chem. 256, 2284-2288 (1981)
- Harris, R.J.; Greenwell, P. und Symons, R.H.: Affinity Labeling
of Ribosomal Peptidyl Transferase by a Puromycin Analogue.
Biochem. Biophys. Res Commun. 55, 117-124 (1973)
- Högenauer, G.; Egger, H.; Ruf, C. und Stumper, B.: Affinity
Labeling of *Escherichia coli* Ribosomes with a Covalently
Binding Derivate of the Antibiotic Pleuromutilin
Biochemistry 20, 546-552 (1981)
- Hosokawa, K.; Fujimura, R.K. und Nomura, M.: Reconstitution of
Functionally Active Ribosomes from Inactive Subparticles
and Proteins.
Proc Nat. Acad. Sci. 55, 198-204 (1966)
- Hsiung, N.; Reines, S.A. und Cantor, C.R.: Investigation of the
Ribosomal Peptidyl Transferase Centre Using a Photoaffinity
Label.
J. Mol. Biol. 88, 841-855 (1974)
- Jaynes, E.N.; Grant, P.G.; Giangrande, G.; Wieder, R. und Co-
perman, B.S.: Photoinduced Affinity Labeling of the *Esche-*
richia coli Ribosome Puromycin Site

- Biochemistry 17, 561-569 (1978)
- Kaltschmidt, E. und Wittmann, H.G.: Ribosomal Proteins. VII.
Two-Dimensional Polyacrylamid Gel Electrophoresis for
Fingerprinting of Ribosomal Proteins.
Analytical Biochemistry 36, 401-412 (1970a)
- Kaltschmidt, E. und Wittmann, H.G.: Ribosomal Proteins. XII.
Number of Proteins in Small and Large Subunits of *Esche-
richia coli* as Determined by Two-Dimensional Gel Electro-
phoresis.
Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 1276-1282 1970b)
- Kastner, B.; Stöffler-Meilicke, M. und Stöffler, G.: A Novel
Approach to Define the Arrangement of the Subunits in
the Ribosome of *Escherichia coli*.
10th International Congress on Electron Microscopy Ham-
burg, August 17-24. (1982)
- Kimura, M.; Mende, L. und Wittmann-Liebold, B.: The Primary
Structure of Protein L2 from the *Escherichia coli* Ribosome.
FEBS-Lett. 149, 304-312 (1982)
- Kischa, K.; Möller, W. und Stöffler, G.: Reconstitution of a
GTPase Activity by a 50S Ribosomal Protein from *E. coli*.
Nature New Biology 233, 62-63 (1971)
- Knapp, E.; Reuss, A.; Risse, O. und Schreiber, H.: Quantita-
tive Analyse der mutationsauslösenden Wirkung monochro-
matischen UV-Lichtes.
Naturwissenschaften 27, 304 (1939)
- Krassnigg, F.; Erdmann, V.A. und Fasold, H.: The Synthesis of
a Photoreactive Puromycin Analogue and Its Application
for Labeling Proteins in the 50S Subunit of *Escherichia
coli* Ribosomes.
Eur. J. Biochem. 87, 439-443 (1978)
- Lake, J.A.: Ribosome Structure and Functional Sites
in Ribosomes- Structure, Function and Genetics (ed. Cham-
bliss, G.; Craven, G.R.; Davies, J.; Davis, K.; Kahan, L.;
Nomura, M.) University Park Press, Baltimore, 207-236 (1979)
- Lake, J.A.: Protein Synthesis from Recognition to the Nascent
chain.
Seventh Embo Annual Symposium 1981: Ribosome, Structure

and Function, Speakers Abstracts.

- Le Goffic, F.; Capmau, M.L.; Chaussou, L. und Bonnet, D.: Photo-induced Affinity Labeling of Escherichia coli Ribosomes by Chloramphenicol.
Eur. J. Biochem. 106, 667-674 (1980)
- Lin, A.; Collatz, E. and Wool, I.G.: Micro-Scale Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Ribosomal Proteins.
Mol. Gen. Genet. 144, 1-9 (1976)
- Lührmann, R. Identifizierung der Proteine S1, S12 und S18 als Komponenten der 30S ribosomalen Codon-Bindestelle.
Dissertation, Münster (1976)
- Lührmann, R.; Bald, R., Stöffler-Meilicke, M. und Stöffler, G.: Localization of the 50S Ribosomal Puromycin Binding Site by Immuno Electron Microscopy.
Proc. Nat. Acad. Sci. 78, 7276-7280 (1981)
- McKuskie-Olson, H.; Grant, P.G.; Glitz, D.G. und Cooperman, B.S.: Immunelectron Microscopic Localization of the Photo-Induced Affinity Labeling of the Small Ribosomal Subunit with Puromycin.
Proc. Nat. Acad. Sci. 77, 890-894 (1980)
- McKuskie-Olson, H.; Grant, P.G.; Cooperman, B.S. und Glitz, D.G.: Immunelectron Microscopic Localization of Puromycin Binding on the Large Subunit of the Escherichia coli Ribosome.
J. Biol. Chem. 257, 2649-2656 (1982)
- Mende, L.: The Primary Structure of Protein L13 from the Large Subunit of Escherichia coli Ribosomes.
FEBS-Lett. 96, 313-316 (1978)
- Mets, L.J. und Bogorad, L.: Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis: An Improved Method for Ribosomal Proteins.
Analytical Biochemistry 57, 200-210 (1974)
- Miescher, F.: Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen.
Hoppe-Seylers Medizinisch-Chemischen Untersuchungen 441-460 (1871)

- Nicholson, A.W. und Cooperman, B.S.: Photoaffinity Labeling of Escherichia coli Ribosomes with an Aryl Azide Analogue of Puromycin.
FEBS-Lett. 90, 203-208 (1978)
- Nicholson, A.W.; Hall, C.C.; Strycharz, W.A. und Cooperman, B.S.: Photoaffinity Labeling of Escherichia coli Ribosomes by an Aryl Azide Analogue of Puromycin. On the Identification of the Major Covalently Labeled Ribosomal Proteins and on the Mechanism of Photoincorporation.
Biochemistry 21, 3797-3808 (1982)
- Nierhaus, K.H.: Analysis of the Assembly and Function of the 50S Subunits from Escherichia coli Ribosomes by Reconstitution .
in Ribosomes- Structure, Function and Genetics (ed. Chambliss, G.; Craven, G.R.; Davies, J.; Davis, K.; Kahan, L.; Nomura, M.) University Park Press, Baltimore, 267-294 (1979)
- Nierhaus, K.H.: Structure, Assembly and Function of Ribosomes.
in Current Topics in Microbiology and Immunology 97,
(ed. Henle, W.; Hofschneider, P.H.; Koprowski, H.; Melchers, F.; Rott, R.; Schweiger, H.G. und Vogt, P.K.)
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 81-155 (1982)
- Nierhaus, K.H. und Dohme, F.: Total Reconstitution of Functionally Active 50S Ribosome Subunits of Escherichia coli.
Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 4713-4717 (1974)
- Nierhaus, K.H. und Montejó, V.: A Protein Involved in the Peptidyltransferase Activity of Escherichia coli Ribosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 1931-1935 (1976)
- Noll, M.; Hapke, B. und Noll, H.: Structural Dynamics of Bacterial Ribosomes/Praeparation and Characterization of Ribosomes and Subunits Active in the Translation of Natural Messenger RNA.
J. Mol. Biol. 80, 519-529 (1973)
- Nomura, M. und Erdmann, V.A.: Reconstitution of 50S Ribosomal Subunits from Dissociated Molecular Components.
Nature 228, 744-748 (1970)
- Oen, H.; Pellegrini, M.; Eilat, D. und Cantor, C.R.: Identifi-

- cation of SOS Proteins at the Peptidyl-tRNA Binding Site of *Escherichia coli* Ribosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2799-2803 (1973)
- Duchterlony, O.: Diffusion in Gel. Methods for Immunological Analysis.
Prog. Allergy 5, 1-78 (1958)
- Pellegrini, M. und Cantor, C.R.: Affinity Labeling of Ribosomes. in Molecular Mechanism of Protein Biosynthesis (ed. Weissbach, H. und Pestka, S.) Academic Press, New York 203-244 (1977)
- Pieler, T. und Erdmann, V.A.: Three-Dimensional Structural Model of Eubacterial 5S RNA that Has Functional Implications. Proc. Nat. Acad. Sci. 79, 4599-4603 (1982)
- Pongs, O.; Bald, R. und Erdmann, V.A.: Identification of Chloramphenicol Binding Protein in *Escherichia coli* Ribosomes by Affinity Labeling.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2229-2233 (1973)
- Pongs, O.; Bald, R.; Wagner, T. und Erdmann, V.A.: Irreversible Binding of N-Iodoacetylpuromycin to *E. coli* Ribosomes. FEBS-Lett. 35, 137-140 (1973)
- Pongs, O.; Nierhaus, K.H.; Erdmann, V.A. und Wittmann, H.G.: Active Sites in *Escherichia coli* Ribosomes. FEBS-Lett. 40 Supplement, 528-537 (1974)
- Rombauts, W.; Feytons, V. und Wittmann-Liebold, B.: The Primary Structure of L17 from the *Escherichia coli* Ribosome. FEBS-Lett. 149, 320-327 (1982)
- Schulze, H. und Nierhaus, K.H.: Minimal Set of Ribosomal Components for Reconstitution of the Peptidyltransferase Activity.
The Embo Journal 1, 609-613 (1982)
- Sherton, C.C. und Wool, I.G.: Determination of the Number of Proteins in Liver Ribosomes and Ribosomal Subunits by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J. Biol. Chem. 247, 4460-4467 (1972)
- Shine, J. und Dalgarno, L.: The 3'-terminal Sequence of *Escheri-*

chia coli 16S Ribosomal RNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites.

Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 1342-1346 (1974)

Sonenberg, N.; Wilchek, M. und Zamir, A.: Mapping of Escherichia coli Ribosomal Components Involved in Peptidyl Transferase Activity.

Proc. Nat. Acad. Sci. 70 1423-1426 (1973)

Sopori, M.; Pellegrini, M.; Lengyel, P. und Cantor, C.R.: Affinity Labeling of Escherichia coli Ribosomal Proteins with an Analog of the Natural Initiator-tRNA.

Biochemistry 13, 5432-5439 (1974)

Staehelin, T. und Meselson, M.: In Vitro Recovery of Ribosomes and of Synthetic Activity from Synthetically Inactive Ribosomal Subunits.

J. Mol. Biol. 16 245-249 (1966)

Stöffler, G.: A Rapid Micromethod for Electrophoretic Separation of Escherichia coli Ribosomal Proteins on Gelatinized Cellulose Acetate.

Mol. Gen. Genet. 100, 374-377 (1967)

Stöffler, G.; Bald, R.; Kastner, B.; Lührmann, R.; Stöffler-Meilicke, M.; Tischendorf, G. und Tesche, B.: Structural Organization of the Escherichia coli Ribosome and Localization of Functional Domains.

in Ribosomes-Structure, Function and Genetics (ed. Chambliss, G.; Craven, G.R.; Davies, J.; Davis, K.; Kahan, L.; Nomura, M.) University Park Press, Baltimore, 171-205 (1979)

Stöffler, G. und Stöffler-Meilicke, M.: Structural Organization of the Escherichia coli Ribosomes and Localization of Functional Domains.

in International Cell Biology 1980-1981 (ed. Schweiger, H.G.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 93-102 (1981)

Studier, F.W.: Analysis of Bacteriophage T7 Early RNAs and Proteins on Slab Gels.

J. Mol. Biol. 79, 237-248 (1973)

Traub, P. und Nomura, M.: Structure and Functions of Escherichia

- coli Ribosomes. V. Reconstitution of Functionally Active 30S Ribosomal Particles from RNA and Proteins.
Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 777-784 (1968)
- Traut, R.R.; Lambert, J.M.; Boileau, G. und Kenny, J.W.:
Protein Topography of Escherichia coli Ribosomal Subunits as Inferred from Protein Crosslinking.
in Ribosomes-Structure, Function and Genetics (ed. Chambliss, G.; Craven, G.R.; Davies, J.; Davis, K.; Kahan, L.; Nomura, M.) University Park Press, Baltimore, 89-110 (1979)
- Traut, R.R. und Monro, R.E.: The Puromycin Reaction and its Relation to Protein Synthesis.
J. Mol. Biol. 10, 63-72 (1964)
- van Holde, K.E. und Hill, W.E.: General Physical Properties of Ribosomes.
in Ribosomes (ed. Nomura, M.; Tissières, A.; Lengyle, P.) Cold Spring Harbour Laboratory, 53-91 (1974)
- Vázquez, D.: Translation Inhibitors.
International Review of Biochemistry, Amino Acid and Protein Biosynthesis II. Vol 18 (ed. Arnstein, H.R.V.) University Park Press, Baltimore 169-232 (1978)
- Waller, J.P. und Harris, J.J.: Studies on the Composition of the Protein from Escherichia coli Ribosomes.
Proc. Nat. Acad. Sci. 47, 18-23 (1961)
- Watson, J.D. und Crick, F.H.C.: A Structure for Desoxyribose Nucleic Acid.
Nature 171, 737-738 (1953)
- Wienen, B.; Ehrlich, R.; Stöffler-Meilicke, M.; Stöffler, G.; Smith, J.; Weiss, D.; Vince, R. und Pestka, S.: Ribosomal Protein Alterations in Thiostrepton- and Micrococcin-Resistant Mutants of Bacillus subtilis.
J. Biol. Chem. 254, 8031-8041 (1979)
- Wischnath, G.; Erdmann, V.A. und Pongs, O.: Labeling of B. stearothermophilus Ribosomes with Monojodamphenicol and N-Jodoacetylpuromycin.
in Ribosomes and RNA Metabolism 2, (ed. Zelinka, J. und Balan, J.) Publishing House of the Slovak Academy of

- Science, Bratislava (1976)
- Wittmann, H.G.: Components of Bacterial Ribosomes.
Ann. Rev. Biochem. 51, 155-183 (1982)
- Wittmann, H.G.; Littlechild, J.A. und Wittmann-Liebold, B.:
Structure of Ribosomal Proteins.
in Ribosomes-Structure, Function and Genetics (ed. Cham-
bliss, G.; Craven, G.R.; Davies, J.; Davis, K.; Kahan, L.;
Nomura, M.) University Park Press, Baltimore, 51-88 (1979)
- Wittmann-Liebold, B. und Greuer, B.: Primary Structure of Pro-
tein L23 from Escherichia coli Ribosome.
FEBS-Lett. 108, 69-74 (1979)
- Wool, I.G.: The Structure and Function of Eucaryotic Ribosomes.
Ann. Rev. Biochem. 48, 719-754 (1979)
- Yaguchi, M.: Primary Structure of Protein S18 from the Small
Escherichia coli Ribosomal Subunit.
FEBS-Lett. 59, 217-220 (1975)
- Zubke, W.; Stadler, H.; Ehrlich, R.; Stöffler, G. und Wittmann,
H.G.: Improved Electrophoretic and Immunochemical Tech-
nique for the Identification and Characterization of
Mutant Proteins Applied to Ribosomal Protein S8 in
Escherichia coli Mutants.
Mol. Gen. Genet. 158, 129-139 (1977)

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BAP N-Bromacetylpuromycin

BAP-Pan-Phe 5'-O-(N-bromacetyl-p-aminophenylphosphoryl)-3'-N-
L-phenylalanyluromycin

CAG Celluloseacetatgelelektrophorese

cpm counts per minute

2D Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

JAA Jodacetamid

JAM Jodamphenicol

K-W nach Kaltschmidt und Wittmann

Oucht. Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony

TP30 (50) Gesamtprotein der 30S Untereinheit (50S Untereinheit)

UpM Umdrehungen pro Minute

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik angefertigt. Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Wittmann für seine Unterstützung, mit der er meine Arbeit ermöglicht hat.

Herrn Prof. Stöffler gilt mein besonderer Dank für seine hilfreichen Ratschläge und seine unermüdliche Gesprächsbereitschaft, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Bald danke ich für die gute Einführung in die Geheimnisse der Affinitätsmarkierung.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die vielen Hilfestellungen und besonders für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre bedanken.

Den Mitgliedern meiner Wohngemeinschaft danke ich dafür, daß sie mich während der ganzen Arbeit freundschaftlich unterstützt haben.

Besonders möchte ich aber Frau U. Lange und Frau M. Thomsen, die für mich das Manuskript getippt hat, danken für die vielen Hilfestellungen und Aufmunterungen in nicht immer leichten Zeiten.

LEBENS LAUF

Name, Vorname:	Schuster, Lennart
Geburtstag, -ort:	23. 04. 54 in Bremen
Ausbildung:	
1961 - 1965	Grundschule Bremen-Osterholz
1965 - 1973	Altes Gymnasium, Bremen
1973 - 1976	Studium der Chemie an der Freien Universität, Berlin (Vordiplom)
1976 - 1980	Studium der Biochemie an der Freien Universität, Berlin
1978 - 1979	Anfertigung der Diplomarbeit am Max- Planck-Institut für Molekulare Gene- tik, Berlin. Abteilung: Prof. Witt- mann, Arbeitsgruppe: Prof. Erdmann
17. 03. 1980	Diplomhauptprüfung
Seit April 1980	Anfertigung der Dissertation am Max- Planck-Institut für Molekulare Gene- tik, Berlin. Abteilung: Prof. Witt- mann, Arbeitsgruppe: Prof. Stöffler

